

Universidade Nova de Lisboa  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Grupo de Disciplinas Ecologia da Hidrosfera

# Metodologias de limpeza e desinfecção de embalagens de madeira e plástico para produtos hortofrutícolas – análise comparativa

Cristiana Marina das Neves Silva Carvalho Nunes

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

Monte de Caparica

2010



“Metodologias de limpeza e desinfecção de embalagens de madeira e plástico para produtos hortofrutícolas – análise comparativa” © Cristiana Nunes, FCT/UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Quero agradecer, em primeiro lugar, à Professora Doutora Benilde Mendes, na qualidade de coordenadora do GDEH por me ter proporcionado as condições necessárias para a realização do Mestrado, e por sempre se ter mostrado atenta às necessidades dos alunos.

À Professora Doutora Ana Luísa Fernando, na qualidade de professora e orientadora, por me ter acompanhado durante o percurso académico e dado todo o apoio necessário à realização e conclusão deste trabalho, sem a ajuda da qual não teria sido possível.

Ao UBiA (Unidade de Biotecnologia Ambiental) por me ter proporcionado uma bolsa em *part time* para a realização do trabalho.

À EMBAR, pela oportunidade de realização deste trabalho

À D. Lurdes, D. Rosa e D. Rita por mostrarem sempre simpatia e disponibilidade para ajudar.

A todos os colaboradores do GDEH e aos colegas de curso que tornaram os dias de trabalho sempre agradáveis.

À minha família, por sempre me incentivar e apoiar durante todo este percurso.



## **Resumo**

A madeira continua a ser um material de grande utilização no acondicionamento e transporte de produtos hortofrutícolas, apesar de gradualmente se verificar uma tendência para a sua substituição por caixas de plástico. Um dos motivos para esta substituição é a suposta maior dificuldade de higienização da madeira, relativamente ao plástico.

Este trabalho pretende assim testar se as caixas de madeira utilizadas no transporte e armazenamento de produtos hortofrutícolas são, de facto, um material de mais difícil higienização, comparativamente às caixas de plástico, dado que não existem evidências científicas do facto para este tipo de embalagens.

Para tal, avaliou-se a contaminação microbiológica das caixas de madeira e de plástico utilizadas no acondicionamento e transporte de produtos hortofrutícolas, antes e após o processo de higienização aplicado. Estudaram-se três métodos de higienização distintos: água corrente, água à pressão e desinfectante bactericida diluído em água.

Os resultados obtidos permitem concluir que de uma forma geral a madeira apresenta efectivamente uma higienização mais difícil, relativamente ao plástico, sendo que nenhum dos três métodos testados neste trabalho se revelou totalmente eficiente na sua higienização. No entanto a utilização de desinfectante diluído em água foi o método de higienização mais eficiente, sobretudo quando utilizado no plástico.

**Palavras-chave:** Madeira, Plástico, Embalagens, Métodos de Higienização.





## **Abstract**

Wood is still a widely used material on packaging and transportation of fruits and vegetables, in spite of its increasing replacement for plastic crates. One reason for this replacement is the assumption that cleaning wood is much more difficult than cleaning plastic.

This work aims to demonstrate if wood crates used for transportation and storage of fruits and vegetables are indeed more difficult to sanitize than plastic crates, once for this type of packages, no scientific evidences are yet reported concerning this fact.

Thus, the microbiological contamination of wood and plastic crates used on the packaging and transportation of fruit and vegetables, was evaluated, before and after the cleaning process. Three different cleaning methods were studied: tap water, tap water under pressure and disinfectant diluted in water.

The results allow to conclude that wood is more difficult to clean than plastic, although none of the cleaning procedures was totally efficient.

However, the use of disinfectant was the most efficient method, especially when applied to plastic crates.

**Key words:** Wood, Plastic, Packaging, Higienization Methods



# Índice

1. Introdução .....	1
2. Conceito de Embalagem .....	3
2.1 Embalagem de Produtos Hortofrutícolas .....	5
2.1.1 Embalagens de Madeira .....	9
2.1.2 Embalagens de Plástico .....	11
2.2 Higienização das Embalagens de Produtos Hortofrutícolas .....	16
3. Ensaio, Materiais e Métodos .....	29
3.1 Métodos .....	31
3.1.1 Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (ISO 6222:1999) .....	33
3.1.2 Contagem de bolores e leveduras a 25°C (NP 3277-1:1987) .....	33
3.1.3 Contagem de bolores e leveduras a 37°C (NP 3277-2:1987) .....	33
3.1.4 Contagem de bactérias coliformes (ISO 4831:2006) .....	34
3.1.5 Contagem de <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.1.6 Contagem de Enterococos (ISO 7899-1: 1998) .....	34
3.1.7 Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Dutka, 1978) .....	35
3.1.8 Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> (Fernando, 1996) .....	36
3.1.9 Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (National Standard Method F15i1.4, 2005) .....	36
3.2 Análise estatística .....	36
4. Apresentação e Discussão de Resultados .....	39
4.1 Microrganismos totais viáveis a 22°C e a 37°C .....	39
4.2 Bolores e Leveduras a 37°C e 25°C .....	45
4.3 <i>Bacillus cereus</i> .....	52
4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	55
4.5 Bactérias coliformes e <i>Escherichia coli</i> .....	58
4.6 Enterococos .....	64
4.7 <i>Clostridium perfringens</i> .....	66
4.8 Análise global .....	70
5. Conclusões e Recomendações .....	73
6. Bibliografia .....	75



## Índice de Figuras

Figura 2.1 – Representação dos três diferentes níveis de embalagem, da primária para a terciária, de baixo para cima (Gustafsson <i>et al</i> , 2006).....	3
Figura 2.2 – Caixa de fruta com absorvedor de etileno (Fontes & Guarienti, 2007) .....	4
Figura 2.3 – Embalagem de venda (invólucro plástico) e de transporte (caixa cartão) à esquerda [2], e carga unitária à direita [3]. .....	6
Figura 2.4 – Tomate-cereja pré-embalado [4].....	7
Figura 2.5 – Caixa com distribuição <i>pattern-pack</i> [5] .....	7
Figura 2.6 – Caixa com distribuição por volume [6] .....	8
Figura 2.7 – Caixa com meloas em tabuleiro alveolado [7].....	8
Figura 2.8 – Caixa com fruta revestida a plástico [8] .....	8
Figura 2.9 – Caixa “pesada” [11] .....	9
Figura 2.10 – Palete [12] .....	10
Figura 2.11 - Caixas “ligeiras” de pinho [13] (à esquerda) e choupo (Abrantes, 2008) (à direita).....	10
Figura 2.12 – Estrutura química do polietileno.....	11
Figura 2.13 – Estrutura química do polipropileno isotático[14] .....	12
Figura 2.14 – Caixa de plástico de empilhamento [15].....	13
Figura 2.15 – Caixa de plástico encastrável (Rapusas & Rolle, 2009) .....	13
Figura 2.16 – Caixa de plástico colapsável [16, 17] .....	14
Figura 2.17 – Caixa de plástico empilhável e encastrável [18] .....	14
Figura 2.18 – Caixa de plástico com aditivo antimicrobiano – Microban® (Poças & Oliveira, 2001) 14	
Figura 2.19 – Caixa plástica de PET com tampa.[20].....	14
Figura 2.20 – Estrutura química do poli(tereftalato de etileno) .....	14
Figura 2.21 – Perigos biológicos, como bactérias, insectos, roedores (a) ou fungos (c), físicos, como vidros, lixo, poeiras (b) e químicos, como resíduos de fertilizantes e pesticidas (d).(Abrantes, 2008) .....	1420
Figura 2.22 – Representação esquemática de uma cadeia de abastecimento genérica de produtos hortofrutícolas exportados. (Almeida, 2005) .....	23
Figura 2.23 – Exemplos de mau acondicionamento de embalagens contendo hortofrutícolas. (Camelo, 2004) .....	1425
Figura 2.24 – Método de higienização de caixas de plástico, por imersão em água clorada .....	26
(Rapusas & Rolle, 2009) .....	26
Figura 3.1 – Lavagem de caixa de plástico com água corrente.....	30
Figura 3.2 – Lavagem de caixa de plástico com desinfetante diluído em água.....	31
Figura 3.3 – Zaratogaa efectuada a uma embalagem de plástico após o processo de lavagem e desinfecção.....	32
Figura 4.1 – Valores médios da contagem de microrganismos totais viáveis a 37°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.....	40
Figura 4.2 – Valores médios da contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.....	41
Figura 4.3 - Valores médios da contagem de bolores e leveduras a 37°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. ....	46
Figura 4.4 - Valores médios da contagem de bolores e leveduras a 25°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização .....	49
Figura 4.5 - Valores médios da contagem de <i>Bacillus cereus</i> , nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. Nota: as colunas marcadas com asterisco, representam o limite de detecção do método, uma vez que não foram detectadas, em	

nenhuma amostra, colónias de <i>B. cereus</i> .....	51
Figura 4.6 - Valores médios da contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ensaio presumptivo), nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.....	54
Figura 4.7 - Valores médios da contagem de bactérias coliformes, nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. ....	57
Figura 4.8 - Valores médios da contagem de <i>E.coli</i> , nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.....	59
Figura 4.9 - Valores médios da contagem de enterococos nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. ....	63
Figura 4.10 - Valores médios da contagem de <i>Clostridium perfringens</i> (ensaio presumptivo), nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. ....	65
Figura 4.11 – Valores médios dos resultados obtidos antes da lavagem nas superfícies das embalagens de hortofrutícolas analisadas.....	68
Figura 4.12 – Valores médios dos resultados aceitáveis (%) obtidos após higienização das embalagens de hortofrutícolas analisadas por tipo de material (plástico e madeira).....	69
Figura 4.13 – Valores médios dos resultados aceitáveis (%) obtidos após higienização das embalagens de hortofrutícolas analisadas por tipo de metodologia.....	70

## Índice de Quadros

Quadro 1.1 - Alguns exemplos de perigos microbiológicos de possível presença em alimentos. (Adaptado de Poças & Moreira, 2003).....	1
Quadro 2.1 – Propriedades básicas do Polietileno de Alta Densidade (PEAD) e do Polipropileno (PP). (Adaptado de Beswick & Dunn, 2002) .....	12
Quadro 2.2 – Comparação entre a madeira e o plástico na constituição de paletes. (Beswick & Dunn, 2002) .....	16
Quadro 2.3 – Classificação de atributos de qualidade (Almeida, 2005) .....	17
Quadro 2.4 – Bactérias patogénicas associadas a frutas e hortaliças (Almeida, 2005; FDA, 2001).....	21
Quadro 4.1 – Contagem de microrganismos totais viáveis a 37°C (log ufc/cm <sup>2</sup> ) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	39
Quadro 4.2 - Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C (log ufc/cm <sup>2</sup> ) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	42
Quadro 4.3 - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de totais viáveis a 37°C e a 22°C. ....	44
Quadro 4.4 - Contagem de Bolors e Leveduras a 37°C (log ufc/cm <sup>2</sup> ) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	46
Quadro 4.5 - Contagem de Bolors e Leveduras a 25°C (log ufc/cm <sup>2</sup> ) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	48
Quadro 4.6 - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de bolors e de leveduras a 37°C e a 25°C. ....	51
Quadro 4.7 – Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (log ufc/cm <sup>2</sup> ), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	53
Quadro 4.8 - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de <i>B. cereus</i> .....	54
Quadro 4.9 - Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ensaio presumptivo) (log NMP/cm <sup>2</sup> ), nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.....	56
Quadro 4.10 - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de <i>P. aeruginosa</i> (ensaio presumptivo).....	58
Quadro 4.11 - Contagem de bactérias coliformes (log NMP/cm <sup>2</sup> ), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	59
Quadro 4.12 - Contagem de <i>Escherichia coli</i> (log NMP/cm <sup>2</sup> ), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	61
Quadro 4.13 - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de bactérias coliformes e de <i>E. coli</i> .....	63
Quadro 4.14 - Contagem de enterococos (log NMP/cm <sup>2</sup> ), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.....	64

Quadro 4.15 - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de enterococos. .	66
Quadro 4.16 - Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> (ensaio presumptivo)(log NMP/cm <sup>2</sup> ), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização. ....	67
Quadro 4.17 - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de <i>C. perfringens</i> (ensaio presumptivo) .....	69



## **Simbologia e Notações**

BPA's	Boas Práticas Agrícolas
BPF's	Boas Práticas de Fabrico
DL	Decreto-Lei
EMBAR	Associação Nacional de Recuperação e Reciclagem de Resíduos de Embalagens de Madeira
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
FDA	“Food and Drug Administration”
GDEH	Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera
HACCP	“Hazard Analysis Critical Control Point”
ISO	“International Organization for Standardization”
Log	Logaritmo
MARL	Mercado Abastecedor da Região de Lisboa
NMP	Número mais provável
NP	Norma Portuguesa
$p$	Probabilidade
PEAD	Polietileno de alta densidade
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PP	Polipropileno
TTI	“Time Temperature Indicator”
ufc	Unidades formadoras de colónias



## 1. Introdução

As embalagens alimentares devem cumprir um conjunto de requisitos legais, de forma a se considerarem seguras para o acondicionamento dos géneros alimentícios. Os limites de migração de materiais permitem assegurar uma ausência de perigos químicos, enquanto as boas práticas de manipulação, por implementação do HACCP, diminuem a ocorrência de perigos físicos e microbiológicos [1].

Os microrganismos estão presentes, naturalmente, em grande parte dos géneros alimentícios, e exceptuando aqueles essenciais na elaboração do produto, devem ser eliminados no decorrer do processamento, de forma a evitar consequências negativas para o consumidor. No Quadro 1.1 estão indicados alguns dos perigos microbiológicos que podem ocorrer em diversos tipos de alimentos.

**Quadro 1.1** - Alguns exemplos de perigos microbiológicos de possível presença em alimentos. (Adaptado de Poças & Moreira, 2003)

Bactérias Patogénicas Gram <sup>-</sup>	Bactérias Patogénicas Gram <sup>+</sup>	Parasitas e Protozoários	Vírus
<i>Salmonella</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Taenia saginata</i>	
<i>Shigella</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Trichinella spiralis</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>	Hepatite A
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	Norwalk vírus
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		<i>Giardia intestinalis</i>	
<i>Pseudomonas</i>			

A maioria dos microrganismos é eliminada durante o processamento normal dos alimentos, como algumas bactérias, vírus e parasitas e protozoários. No entanto, no que toca a hortofrutícolas, o processamento é maioritariamente baixo ou inexistente, sendo que a maioria destes produtos são consumidos “a fresco”. O elevado teor de nutrientes de alguns destes alimentos, associados à grande disponibilidade de água dos mesmos, faz assim com que estes constituam um meio favorável para a multiplicação de microrganismos (Lidon & Silvestre, 2008).

Diversos estudos apontam a ocorrência de contaminação por patogénicos nestes géneros alimentícios, de que são exemplo *Shigella* spp. e *Escherichia coli* em alfaces, *Salmonella* em cebolas e tomates, *Bacillus cereus* em couves, Norwalk vírus em melões, tomates e vários

tipos de verduras e vírus da Hepatite A em alface e amoras e morangos congelados (Roever, 1998).

A propagação destes microrganismos não só pode comprometer seriamente a segurança do consumidor, por ingestão dos próprios ou de toxinas por eles produzidas, como acelera a decomposição dos produtos, provocando alterações sensoriais e físico-químicas, que o inviabilizam para consumo (Lidon & Silvestre, 2008).

Os alimentos contaminados podem contaminar as embalagens utilizadas no seu acondicionamento e as embalagens, se não forem adequadamente higienizadas entre utilizações, podem também contribuir para a contaminação dos alimentos acondicionados.

As embalagens de madeira têm sido largamente utilizadas na indústria alimentar devido, essencialmente, à sua estabilidade, durabilidade e facilidade de manuseamento (Milling *et al*, 2005). No entanto, regra geral, têm vindo a ser consideradas menos seguras, comparativamente com outros tipos de materiais utilizados na embalagem de alimentos. As principais razões para o descrédito deste produto são a possibilidade de ocorrência de lascas, provenientes do desgaste do material, e a sua elevada porosidade, que absorve e retém muitos microrganismos e pode dificultar a higienização (Milling *et al*, 2005).

Este estudo pretende assim, por um lado, demonstrar qual a metodologia mais eficaz na higienização de embalagens de madeira utilizadas no acondicionamento e transporte de hortofrutícolas e, por outro lado, por comparação com o plástico, verificar se a madeira é efectivamente um material de higienização mais difícil. Esta intenção surgiu na sequência do protocolo estabelecido entre a EMBAR (Associação Nacional de Recuperação e Reciclagem de Resíduos de Embalagens de Madeira) e o Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera (GDEH), da FCT/UNL. Este protocolo tem como principal finalidade dar suporte, em termos científicos, a estas e outras questões suscitadas por esta associação e seus respectivos associados.

Para tal foram realizadas contagens microbiológicas antes e após a higienização das embalagens, quer de madeira quer de plástico, tendo-se utilizado três métodos de higienização distintos – limpeza com água corrente, limpeza com água à pressão e limpeza com desinfectante diluído em água.

## 2. Conceito de Embalagem

O DL 366/A-97 considera embalagem “todos e quaisquer produtos feitos de materiais de qualquer natureza utilizado para conter, proteger, movimentar, manusear, entregar e apresentar mercadorias, tanto matérias-primas como produtos transformados, desde o produtor ao utilizador ou consumidor, incluindo todos os artigos “descartáveis” utilizados para os mesmos fins...”

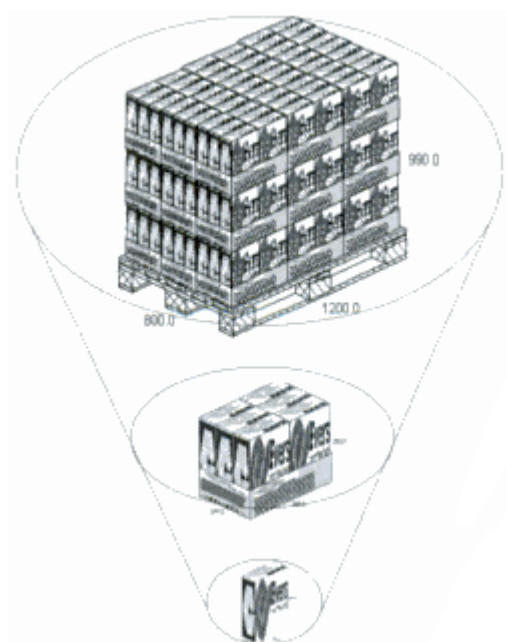
Estas são agrupadas em três níveis distintos:

Embalagem primária, que compreende as embalagens concebidas de forma a constituírem uma unidade de venda para o utilizador final, estando as mesmas em contacto directo com o produto (Fernando, 2008);

Embalagem secundária, que se baseia numa embalagem concebida de forma a agrupar um conjunto definido de unidades de venda, e cuja exclusão não afecta as características do produto (Fernando, 2008);

Embalagem terciária que engloba qualquer embalagem concebida de forma a permitir uma mais fácil movimentação e transporte de um conjunto de unidades de venda com vista a preservar a sua integridade física durante todo o processo (Fernando, 2008).

A Figura 2.1 apresenta um exemplo de organização de um produto nos três diferentes tipos de embalagem.



**Figura 2.1** – Representação dos três diferentes níveis de embalagem, da primária para a terciária, de baixo para cima (Gustafsson *et al*, 2006)

Uma embalagem alimentar deve cumprir com quatro requisitos fundamentais.

O primeiro é sem dúvida a **Protecção**, contra danos físico-mecânicos, que possam eventualmente ocorrer durante o transporte e distribuição. Estes danos não estão, normalmente, relacionados com a segurança do produto mas sim à sua qualidade, uma vez que a uma protecção não adequada do mesmo leva à sua perda total ou parcial, não sendo assim consumido (Poças e Moreira, 2003).

Outro requisito de extrema importância é a **Conservação**.

As embalagens dos produtos alimentares devem contribuir para o prolongamento da vida útil dos bens alimentares, preservando as suas características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas. Desta forma, de acordo com o tipo de tecnologia utilizada no processamento do produto há que adaptar o tipo de embalagem: ao nível da permeabilidade (a gases, humidade e luz), resistência (mecânica e térmica) e forma (Poças e Moreira, 2003). Actualmente existe também o conceito de embalagem activa (Fig. 2.2), ou seja, esta não constitui apenas uma barreira entre o produto e o exterior. A própria embalagem contém sistemas de preservação do produto alimentar, como por exemplo processos de absorção de oxigénio, etileno, indicadores/controladores de humidade, materiais com propriedades anti-microbianas, entre outros (Poças e Moreira, 2003).



**Figura 2.2** – Caixa de fruta com absorvedor de etileno (Fontes & Guarienti, 2007)

As embalagens são também fundamentais ao nível da **Informação**, quer se trate do processo de distribuição, venda, ou informação do consumidor. No que toca à distribuição a informação deve incidir sobre gestão de *stocks*, preço, rastreabilidade do produto, assim como instruções para o seu armazenamento e manuseamento (Poças e Moreira, 2003).

Em relação ao consumidor a embalagem deve apresentar toda a informação exigida legalmente para rotulagens alimentares, sendo obrigatório, entre outros, a designação do produto.

Toda esta informação se revela de extrema importância ao nível da segurança alimentar, uma vez que devem ser conhecidos todos os aspectos do produto que permitam a sua utilização correcta, ou seja no prazo e nas condições adequadas, onde a sua qualidade e segurança é garantida. Também o conhecimento do número do lote, por exemplo, é relevante, uma vez que permite a rastreabilidade do produto, útil no caso de ocorrência de problemas quer com a matéria-prima, quer com os produtos finais (Poças e Moreira, 2003).

Em relação a este campo, a utilização de embalagens inteligentes, que integram indicadores de tempo/temperatura (TTI's), são particularmente úteis em alimentos comercializados refrigerados ou congelados. Estes sensores indicam, por mudança de cor ou forma, o historial de temperatura a que o produto esteve sujeito (Poças e Moreira, 2003), informando não só o consumidor mas também o distribuidor e todos os intervenientes da cadeia.

Finalmente, a embalagem pode prestar um **Serviço**, ou seja, além de todas as características anteriormente referenciadas as próprias embalagens devem ser práticas e seguras para utilização. Estes requisitos obtêm-se através da utilização, por exemplo, de sistemas de abertura-fácil, da possibilidade de fecho entre utilizações, assim como de aquecer ou cozinhar o produto na própria embalagem sem comprometer a qualidade e segurança do produto (Poças e Moreira, 2003).

## **2.1 Embalagem de Produtos Hortofrutícolas**

Tanto os produtos hortícolas como as frutas possuem uma elevada perecibilidade e, consequentemente, uma vida pós-colheita muito curta. Estas características aliadas a um manuseio inadequado durante a colheita, transporte e comercialização provocam um decréscimo acentuado na quantidade e qualidade destes produtos (Lidon & Silvestre, 2008).

As células dos produtos hortofrutícolas continuam vivas após a colheita, continuando a produzir e consumir energia, durante mais algum tempo. A respiração e a transpiração, define assim, a intensidade dos processos fisiológicos pós-colheita, sendo um dos factores que mais contribui para a deterioração destes produtos (Lidon & Silvestre, 2008). Os factores ambientais, como a humidade, composição atmosférica, temperatura e exposição à luz são, desta forma, decisivos na perda da qualidade do produto. Além deste factor, existem outras causas para a perecibilidade elevada dos hortofrutícolas, nomeadamente danos mecânicos e ataque por pragas e doenças (Poças & Oliveira, 2001). Em relação aos danos mecânicos, estes

podem ser fruto de um empilhamento incorrecto das embalagens, enchimento além da capacidade, resistência deficiente da embalagem, ou ainda de processos de abrasão e vibração, resultantes dos movimentos do produto na embalagem (Poças & Oliveira, 2001).

Assim, a embalagem não é só relevante ao nível da manutenção da integridade física, como deve permitir o arrefecimento após a colheita e a manutenção de uma temperatura adequada durante o transporte e armazenamento, através de uma correcta ventilação (Poças & Oliveira, 2001).

Os sistemas de embalagem utilizados para produtos hortofrutícolas podem ser classificados de diferentes maneiras, de acordo com a etapa da cadeia de distribuição na qual intervêm (Poças & Oliveira, 2001):

- Embalagens de venda, ou para consumidor são aquelas nas quais o consumidor faz a recepção do produto, podendo esta ser utilizada desde o campo até ao ponto de venda.
- Embalagem de transporte é, geralmente, a principal na protecção do produto, sendo introduzida no início da cadeia e utilizada até como expositor no ponto de venda.
- Carga unitária, frequentemente designada por paletes, permite manusear de forma mais eficiente grandes quantidades de produto.

Um exemplo de cada tipo de embalagem é apresentado na Figura 2.3:



**Figura 2.3** – Embalagem de venda (invólucro plástico) e de transporte (caixa cartão) à esquerda [2], e carga unitária à direita [3].

A pré-embalagem de produtos hortofrutícolas (Figura 2.4) tem-se tornado uma prática recorrente nos últimos anos, uma vez que apresenta vantagens consideráveis, como a redução da taxa de deterioração de produtos, evita o manuseamento pelo consumidor, no acto de compra, reduzindo perdas no produto, e reduz o tempo de pesagem e pagamento.





**Figura 2.4** – Tomate-cereja pré-embalado [4]

No entanto, apesar de todos os factores anteriormente enunciados, os produtos hortofrutícolas continuam a ser, na sua maioria, vendidos a granel. Mesmo aqueles que o não são, utilizam uma embalagem de transporte, até serem pré-embalados para venda ao consumidor. Este acondicionamento de produtos hortofrutícolas pode ser efectuado através de diversos tipos de embalagem, tais como a madeira, plástico, cartão canelado, assim como sacos de grandes dimensões de juta, tela e rede plástica (Poças & Oliveira, 2001).

Independentemente do material de embalagem, o embalamento primário pode ser realizado segundo diferentes processos. No *pattern-pack* os frutos são colocados, de forma manual, mais demorada, ou mecânica, numa determinada posição, sendo o número de frutos por caixa constante (Fig. 2.5). Este processo mantém os frutos imóveis e ordenados, maximizando o peso líquido por embalagem.

O enchimento por volume (Fig. 2.6) consiste no despejar dos frutos/alguns hortofrutícolas para a caixa, sendo depois esta sujeita a uma vibração de forma a procurar uniformizar a distribuição dos mesmos na embalagem (Almeida, 2005).

Em casos mais específicos, como produtos mais sensíveis ou mais dispendiosos, utilizam-se tabuleiros alveolados, de celulose ou plástico (Fig. 2.7) ou revestimento com plástico ou papel (Fig. 2.8), que permite diminuir as perdas de água e os danos por vibração (Almeida, 2005).



**Figura 2.5** – Caixa com distribuição *pattern-pack* [5]



**Figura 2.6** – Caixa com distribuição por volume [6]



**Figura 2.7** – Caixa com meloas em tabuleiro alveolado [7]



**Figura 2.8** – Caixa com fruta revestida a plástico [8]

Existe assim uma grande diversidade de materiais e formas de acondicionamento deste tipo de produtos. A escolha dos mesmos dependerá do tipo de produto e dos custos/benefícios daí adquiridos. Serão abordadas em detalhe as embalagens de madeira e de plástico, por serem o objecto de estudo neste trabalho.

### **2.1.1 Embalagens de Madeira**

A madeira continua a ser um material de uso recorrente a nível da indústria alimentar, sendo utilizada em utensílios (colheres de pau), tábuas de corte, prateleiras, entre outros, assim como na constituição de embalagens, podendo constituir a embalagem primária, secundária ou terciária. Estas embalagens podem ser classificadas em diversos tipos, dependendo da sua forma e aplicação a que se destinam, existindo caixas, paletes, contentores-paleta, bobines e barris de madeira [9].

Esta utilização tão diversificada está muito dependente de características importantes deste material, que a tornam vantajosa comparativamente com o plástico, no fabrico de paletes, por exemplo [10]:

1. Fonte de matéria-prima mais abundante e renovável
2. Transformação da matéria-prima requer poucos gastos energéticos
3. Facilmente reutilizável, reparável e praticamente 100% reciclável
4. Material rígido, resistente ao empilhamento
5. Disponível em formatos e tamanhos variáveis
6. Resistente à humidade

Efectivamente uma das vantagens da madeira é o facto de poder ser trabalhada de diferentes formas, podendo ser cortada, serrada ou desenrolada. Uma vez preparado o corte pode ser agregada recorrendo a pregos, agramos e cola, ou então utilizando a própria estrutura da madeira entaçando-a ou armando-a (Poças & Oliveira, 2001), o que permite obter embalagens de diferentes formas e tamanhos. Enquanto as caixas pesadas (Fig. 2.9) são caixas de maiores dimensões, aptas para o transporte de cargas mais volumosas como peças do sector automóvel, e as paletes (Fig. 2.10) são utilizadas na optimização da carga e protecção do produto, as caixas ligeiras (Fig. 2.11), usualmente fabricadas com madeira de pinho ou choupo, são as mais utilizadas no sector alimentar, em específico no acondicionamento e transporte de hortofrutícolas [9].



**Figura 2.9** – Caixa “pesada” [11]



**Figura 2.10** – Palete [12]



**Figura 2.11** - Caixas “ligeiras” de pinho [13] (à esquerda) e choupo (Abrantes, 2008) (à direita).

As caixas pregadas são rígidas e bastante resistentes, sendo reutilizáveis. Os componentes têm uma espessura superior a 6mm e o espaçamento entre eles permite uma boa ventilação. Estas caixas são frequentemente usadas como caixa de colheita e simultaneamente de transporte (Poças e Oliveira, 2001). As caixas agrafadas ou coladas são caixas normalmente mais leves e menos resistentes, com componentes de espessura de 3 a 4 mm, não sendo reutilizáveis (Poças e Oliveira, 2001). Quanto mais elevada é a densidade da madeira, melhor é a sua resistência mecânica e melhor é a fixação dos elementos de ligação, como pregos ou agrafos (Poças e Oliveira, 2001). O ponto mais fraco da caixa é normalmente o elemento de ligação, por isso particular atenção deve ser dada a este aspecto (Poças e Oliveira, 2001). A madeira deve estar adequadamente seca para evitar fendas e crescimento de bolores durante a sua utilização (Poças e Oliveira, 2001).

Apesar da diversidade de aplicações este tipo de embalagens apresenta algumas desvantagens face a outros materiais. Entre elas destacam-se o espaço requerido para a armazenagem, visto que grande parte dos modelos são pré-montados, o elevado peso e a frequente necessidade de utilização de um sistema de forros de outro material para evitar danos nos produtos por abrasão (Poças & Oliveira, 2001). A madeira é também considerada menos higiénica, por ser um material poroso, possibilitando a contaminação microbiológica, pode lascar e os métodos de higienização e limpeza são deficientes (Revol-Junelles *et al.*, 2005). No entanto, estudos científicos sugerem que estas considerações são baseadas mais em meras assumpções do que em dados científicos (Revol-Junelles *et al.*, 2005). Com efeito, Abrantes (2008), no seu trabalho, verificou a não existência de diferenças significativas entre a contaminação

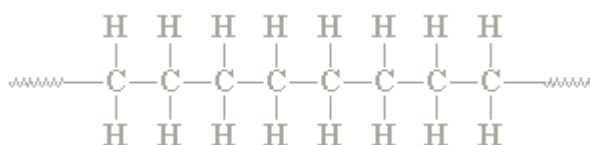
microbiana em caixas de madeira e de plástico, tendo concluído que a contaminação elevada verificada em algumas caixas de madeira e de plástico resultou principalmente da falta de limpeza das caixas entre utilizações. Abrantes (2008), no seu estudo, concluiu também que a madeira não é mais susceptível à contaminação do que o plástico, tendo verificado, no entanto, que quando a madeira é contaminada por bolores e leveduras, estes se multiplicam e se desenvolvem com muita facilidade, ao contrário do que foi observado para os materiais de plástico contaminados por bolores e leveduras. Por outro lado, a contaminação da madeira por *Bacillus cereus* não se desenvolveu, ao contrário do que foi observado nos materiais de plástico contaminados (Abrantes, 2008). De acordo com os resultados dos estudos elaborados na Escandinávia (DTI, sem data), o crescimento bacteriano na madeira é dificultado, sobretudo em madeira seca, devido à presença na composição da madeira de compostos com efeito bactericida.

### 2.1.2 Embalagens de Plástico

O plástico tem desempenhado um papel de extrema importância na indústria das embalagens, da qual se pode destacar a indústria alimentar, devido a razões funcionais e económicas. Tem um custo relativamente reduzido, as embalagens são mais leves e, sobretudo, possuem uma funcionalidade elevada - grande diversidade de formas e tamanhos.

No que toca ao acondicionamento de produtos hortofrutícolas a granel os dois tipos de plástico mais utilizados são o Polietileno de Alta Densidade (PEAD), e o Polipropileno (PP) (Rapusar & Rolle, 2009).

O Polietileno (PE) (Fig. 2.12) é estruturalmente representado por uma cadeia linear de grupos metileno cujas alterações na síntese ao longo dos anos, conduziram ao aparecimento de diferentes tipos, entre os quais o PEAD (Beswick & Dunn, 2002).

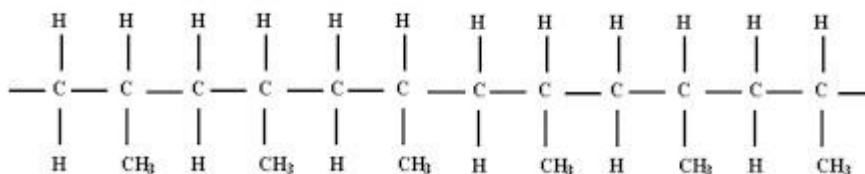


**Figura 2.12** – Estrutura química do polietileno

O PEAD caracteriza-se por uma maior resistência a impactos, assim como maior protecção contra a degradação por ultra-violetas, devido à exposição solar (Rapusar & Rolle, 2009).

Também o polipropileno (PP) é bastante utilizado no fabrico destas embalagens. Este é um polímero de propileno, cuja estrutura química pode apresentar algumas variações.

A nível comercial o polipropileno isotático (Fig. 2.13) é o mais relevante, comparativamente ao atático e sindiotático, uma vez que é a estrutura mais estável.



**Figura 2.13** – Estrutura química do polipropileno isotático[14]

No entanto pode ser utilizada uma pequena porção de polipropileno atático, no final do processamento, de forma a melhorar algumas características do produto, nomeadamente, torná-lo mais moldável e processável (Beswick & Dunn, 2002).

O Quadro 2.1 apresenta uma breve análise comparativa entre estes dois tipos de plástico.

**Quadro 2.1** – Propriedades básicas do Polietileno de Alta Densidade (PEAD) e do Polipropileno (PP). (Adaptado de Beswick & Dunn, 2002)

	PEAD	PP
<b>Resistência a altas temperaturas</b>	Boa	Boa
<b>Resistência a baixas temperaturas</b>	Boa	Suficiente
<b>Barreira à humidade</b>	Excelente	Excelente
<b>Barreira a gases</b>	Pobre	Pobre
<b>Rigidez</b>	Moderada	Alta
<b>Resistência a impactos</b>	Boa	Suficiente
<b>Facilidade de processamento</b>	Boa	Suficiente
<b>Custo</b>	Baixo	Baixo

Independentemente do material utilizado, as embalagens de plástico podem apresentar diferentes *designs*. Podem assim ser categorizadas em caixas de empilhamento (Fig. 2.14), cuja arrumação se baseia na sobreposição das embalagens, caixas encastráveis (Fig. 2.15), uma vez que se arrumam umas dentro de outras, ou caixas colapsáveis (Fig. 2.16), cujo armazenamento após utilização é o que ocupa menos espaço. Surgem ainda outras possibilidades, como caixas encastráveis que possuem patilhas plásticas, ou metálicas, que

possibilitam o empilhamento quando as embalagens estão cheias, evitando a degradação do produto (Fig. 2.17). Estas características são importantes principalmente durante o transporte dos produtos, e após se encontrarem vazias, devido à economia de espaço (Rapusar & Rolle, 2009). Outra das vantagens da utilização de caixas de plástico é a possibilidade do plástico incluir um aditivo que lhe confere propriedades antimicrobianas – o Microban® (Fig. 2.18).



**Figura 2.14** – Caixa de plástico de empilhamento [15]



**Figura 2.15** – Caixa de plástico encastrável (Rapusas & Rolle, 2009)





**Figura 2.16** – Caixa de plástico colapsável [16, 17]



**Figura 2.17** – Caixa de plástico empilhável e encastrável [18]



**Figura 2.18** – Caixa de plástico com aditivo antimicrobiano – Microban® (Poças & Oliveira, 2001)

Embora menos utilizadas, as embalagens de poli(tereftalato de etileno) (PET) com tampa e fundo formadas por plástico têm vindo a ganhar popularidade porque são versáteis, permitem uma boa protecção do produto e a sua apresentação é visualmente atractiva, como se pode observar na Fig. 2.19. Actualmente, existem numerosos produtores, sobretudo produtores

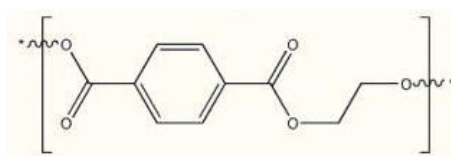


frutícolas, que optaram por este tipo de embalagem, utilizando-a como unidade de venda. Alguns desses produtores acreditam que ao associarem os seus produtos a este tipo de embalagem, que este é identificado pelo consumidor como sendo um produto de elevada qualidade. Este tipo de embalagem permite ainda justificar um valor superior agregado ao produto, uma vez que diminui as perdas por produto deteriorado. É de ter em conta também, que estas embalagens já foram testadas e aprovadas nos mercados mais exigentes da Europa. Para produtos de elevado valor comercial, tais como frutas pequenas, bagas e cogumelos, que podem deteriorar-se facilmente se comprimidos, esta é talvez a melhor opção de embalagem. [19]



**Figura 2.19** - Caixa plástica de PET com tampa.[20]

O PET (Fig. 2.20) constitui uma média barreira à humidade e a gases, mas uma barreira excelente à gordura. Quanto às suas propriedades térmicas, não solda e a sua gama de temperaturas varia entre  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $220^{\circ}\text{C}$ . Tem uma excelente resistência à tracção e boa resistência ao impacto/perfuração, além disso pode apresentar uma excelente transparência (Fernando, 2008; Robertson, 2006).



**Figura 2.20** - Estrutura química do poli(tereftalato de etileno).

Apesar das reconhecidas vantagens, existem alguns potenciais problemas associados aos plásticos, especialmente quando se trata do seu uso para acondicionamento de produtos alimentares.

Os materiais utilizados no fabrico de embalagens têm natureza muito diversa ao nível da sua estrutura química, sendo que as suas propriedades variam de acordo com o processamento sofrido, aditivos incorporados e combinação com outros polímeros.

Os plásticos, devido ao tamanho e estrutura das macromoléculas que os compõem, são materiais bastante inertes, mas cuja presença de moléculas mais pequenas e móveis pode constituir uma fonte de migração entre a embalagem e o produto acondicionado (Poças & Moreira, 2003).

Desta forma, é possível constatar que tanto a utilização da madeira, como do plástico no acondicionamento e transporte de hortofrutícolas, apresentam vantagens e desvantagens que devem ser consideradas aquando da escolha do material. O Quadro 2.2 apresenta uma comparação entre estes dois tipos de materiais, quando são utilizados na produção de paletes.

**Quadro 2.2** – Comparação entre a madeira e o plástico na constituição de paletes. (Beswick & Dunn, 2002)

	Madeira	Plástico
<b>Força</b>	Elevada	Elevado
<b>Rigidez</b>	Elevada	Médio
<b>Resistência ao Impacto</b>	Baixa	Elevado
<b>Durabilidade</b>	Baixa a Média	Elevado
<b>Resistência à Humidade</b>	Baixa	Elevado
<b>Facilidade de Higienização</b>	Baixa	Elevado
<b>Peso</b>	Elevado	Médio
<b>Custo</b>	Baixo	Elevado

De uma forma geral pode constatar-se que o plástico tem como principais vantagens uma maior durabilidade, consequência da melhor resistência ao impacto e humidade, assim como um peso menor, o que facilita o transporte. No entanto, a nível de custos a madeira continua a ser um material mais acessível.

## **2.2 Higienização das Embalagens de Produtos Hortofrutícolas**

No momento de venda ou consumo de qualquer produto alimentar, a qualidade associada a esses produtos é definida de acordo com determinadas características. Em relação aos produtos hortofrutícolas, e uma vez que grande parte destes é consumida sem qualquer tipo de processamento os atributos de qualidade representam ainda maior importância.

Estes atributos podem ser classificados como externos, internos ou ocultos, tal como apresentado no Quadro 2.3.

**Quadro 2.3** – Classificação de atributos de qualidade (Almeida, 2005)

Externos	Internos	Ocultos
Aparência	Odor	Salubridade
Sensação Táctil	Gosto	Valor nutritivo
Defeitos	Textura	Segurança

Os atributos de qualidade externos são aqueles imediatamente perceptíveis no momento da aquisição do produto, e que, usualmente, são o primeiro factor de aprovação/reprovação por parte do consumidor. É de salientar que o odor, apesar de ser um factor perceptível no acto de compra, está relacionado com atributos internos, como o grau de amadurecimento (Almeida, 2005).

Os atributos internos só são apreciados quando o produto é cortado ou consumido. Apesar de não influenciarem a escolha no acto de compra, certamente serão decisivos no que respeita à repetição da sua aquisição, pelo consumidor. A aceitabilidade de um produto é definida pelo conjunto dos seus atributos externos e internos (Almeida, 2005).

Em relação aos atributos ocultos existe uma maior dificuldade na sua avaliação por parte do consumidor. No entanto a percepção que cada consumidor tem acerca destes parâmetros contribui sem dúvida para a aceitação, ou não, dos produtos (Almeida, 2005).

Como já foi referido anteriormente, devido à sensibilidade dos produtos hortofrutícolas, existe um grande número de alterações no período pós-colheita (perda de água, danos mecânicos, podridão) que devem ser minimizados de forma a evitar perda de produto. Do campo à mesa, o emprego de Boas Práticas Agrícolas (BPA's) e Boas Práticas de Fabrico (BPF's) constituem passos importantes para reduzir os possíveis riscos associados aos produtos hortofrutícolas, ao longo das cadeias de produção e de distribuição.

Durante a colheita é essencial que os trabalhadores saibam identificar o estado de maturação dos produtos, assim como a melhor forma de os manipular, sendo de evitar a exposição prolongada ao Sol após a colheita. Uma vez na central hortofrutícola deve ser verificada, por amostragem, o estado de maturação, qualidade e temperatura dos produtos, sendo fundamental implementar um programa de controlo de qualidade, de forma a diminuir a probabilidade de contaminações. Os trabalhadores devem ainda obter formação na identificação e selecção de produtos, de forma a excluir os defeituosos (Almeida, 2005).

De acordo com o National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (1999), Beyer & Guðbjörnsdóttir (2002) e Camelo (2004) devem respeitar-se os seguintes requisitos no armazenamento de frutas e hortaliças:

- Todos os produtos devem armazenar-se num lugar limpo, seguindo um sistema organizado. Os códigos e a rotação de inventários são importantes para minimizar o tempo que o produto permanece armazenado e para facilitar a retirada em caso de problemas a jusante na cadeia alimentar;
- As caixas contendo os produtos devem colocar-se em prateleiras para evitar o contacto directo com o solo;
- Deve haver uma separação mínima entre as prateleiras e a parede de 45 cm. Devem deixar-se 10 cm entre as prateleiras e o solo. Estas separações permitem uma ventilação adequada e facilitam a limpeza e a inspecção para detectar a presença de roedores e insectos;
- Não devem armazenar-se produtos químicos, resíduos, desperdícios ou material oleoso perto dos produtos;
- As áreas ou câmaras de armazenamento de frutas e hortícolas devem ter um controlo preciso e registado da temperatura e humidade para prevenir ou retardar a proliferação microbiana e também para controlar a fisiologia pós-colheita. A temperatura de armazenamento adequada e a humidade relativa variam consideravelmente dependendo do produto e seus requisitos específicos;
- As paredes, solos e tectos devem limpar-se sistemática e periodicamente para evitar a acumulação de sujidade;
- Independentemente da envergadura da operação de produção, as boas práticas de fabrico (BPFs) são essenciais para garantir a consistência na qualidade dos produtos frescos e para prevenir que o ambiente de manipulação se converta numa fonte de contaminação microbiana, física ou química;
- É importante manter todas as áreas de embalagem e armazenamento livres de produtos químicos, lixos, maquinaria, resíduos de colheitas e materiais de desperdícios para não fomentar as pragas e prevenir a contaminação dos produtos hortofrutícolas nas instalações;
- Todo o equipamento utilizado para lavar e classificar os produtos hortofrutícolas frescos deve ser planeado de forma a facilitar a sua limpeza e deve ser mantido adequadamente para prevenir a contaminação;

- Para prevenir a contaminação dos produtos hortofrutícolas, os contentores utilizados para a colheita de frutas e hortaliças, para o seu transporte, embalagem e armazenamento, devem estar limpos e desinfectados e manter-se intactos. Os contentores de plástico devem ser de plástico de grau alimentar;
- Os resíduos e os desperdícios de frutas ou hortaliças podem ser uma fonte de contaminação biológica. Os resíduos e materiais residuais devem armazenar-se em lugares especiais, em contentores que devem permanecer fechados, e devem ser recolhidos diariamente. O lugar de recolha tem de estar construído para uma fácil limpeza, devendo estar localizado de forma a que o vento não leve os odores até às instalações de produção e embalamento ou à zona circundante;
- A limpeza, desinfecção e o controlo de temperatura nas câmaras de armazenamento são factores cruciais para minimizar a contaminação, reduzir as pragas e manter a segurança e qualidade dos produtos. Deve existir um programa de limpeza e desinfecção estabelecido para todas as áreas de armazenamento dos produtos hortofrutícolas;
- Os produtos não devem ser transportados em contentores que tenham sido utilizados para transportar pescado, carne crua, ovos e outros produtos que são importantes fontes de patógenos transmitidos pelos alimentos, a menos que os ditos contentores tenham sido adequadamente limpos e desinfectados. As unidades refrigeradas devem manter as temperaturas adequadas para a segurança e qualidade dos produtos hortofrutícolas.

Portanto, no transporte e acondicionamento de produtos hortofrutícolas, um dos aspectos que não pode ser descurado é o controlo das embalagens utilizadas. Os materiais de embalagem e contentores de expedição necessitam ser verificados, de forma a garantir o cumprimento das especificações, assim como devem ser inspeccionadas amostras aleatórias dos produtos embalados.

Efectivamente o Regulamento 853/2004, respeitante à higiene dos géneros alimentícios, define um conjunto de disposições legais aplicáveis ao acondicionamento e embalagem de géneros alimentícios:

- “ 1. Os materiais de acondicionamento e embalagem não devem constituir fonte de contaminação.

2. Todo o material de acondicionamento deve ser armazenado de forma a não ficar exposto a risco de contaminação.
3. As operações de acondicionamento e embalagem devem ser executadas de forma a evitar a contaminação dos produtos. Sempre que necessário, como nomeadamente no caso de os recipientes serem caixas metálicas ou frascos de vidro, a sua integridade e limpeza têm de ser verificadas antes do enchimento.
4. Os materiais de acondicionamento e embalagem reutilizados para os géneros alimentícios devem ser fáceis de limpar e, sempre que necessário, fáceis de desinfectar. “

A incorrecta manipulação ou acondicionamento dos produtos hortofrutícolas resulta, geralmente, num aumento de risco para a saúde do consumidor, quer seja devido a perigos biológicos, químicos ou físicos. As diferentes fases de operação às quais está sujeito o produto hortofrutícola, permitem múltiplas ocasiões de contaminação, para além da que ocorre naturalmente no campo, própria do tipo de alimento. Os perigos que podem surgir no armazenamento, transporte e manuseamento das embalagens de produtos hortofrutícolas estão representados na Fig. 2.21.



**Figura 2.21** - Perigos biológicos, como bactérias, insectos, roedores (a) ou fungos (c), físicos, como vidros, lixo, poeiras (b) e químicos, como resíduos de fertilizantes e pesticidas (d). (Abrantes, 2008)

No que toca a perigos biológicos, as frutas e hortaliças não são dos alimentos onde o desenvolvimento de microrganismos patogénicos é mais acentuado. O desenvolvimento de microrganismos nestes produtos resulta, geralmente, numa decomposição prematura, com o aparecimento da designada “podridão”, sendo que não chegam a ser consumidos. No entanto, durante todo o processo de manuseamento, as probabilidades de contaminação são elevadas, tendo sido identificado um conjunto de bactérias patogénicas (Quadro 2.4), associadas a hortofrutícolas, e cuja ingestão destes produtos resultou numa intoxicação ou infecção para o consumidor (Almeida, 2005).

**Quadro 2.4** – Bactérias patogénicas associadas a frutas e hortaliças (Almeida, 2005; FDA, 2001)

Intoxicações	Infecções	Tóxico-infecções
<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Shigella</i> spp. <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Clostridium perfringens</i>

Algumas destas bactérias, como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* existem naturalmente no solo, podendo contactar facilmente com muitos dos produtos hortofrutícolas produzidos, contaminando-os. Outras bactérias, como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter* existem no trato intestinal animal. Apesar da infiltração de águas residuais, rega com água contaminada, fertilização orgânica ou presença de animais nos campos agrícolas serem as principais causas da ocorrência destes microrganismos em hortofrutícolas, a contaminação também pode ocorrer como consequência das operações de colheita, preparação para o mercado e distribuição, sendo a higiene dos funcionários e das embalagens essenciais para a manutenção da segurança destes produtos (Almeida, 2005).

A prevenção e o controlo do crescimento de microrganismos é mesmo a melhor forma de assegurar a segurança do consumidor, uma vez que a eficácia de desinfecção de produtos hortofrutícolas é, na maior parte das vezes, limitada. A constituição fisiológica destes produtos, como a sua cutícula hidrofóbica e morfologia da superfície, assim como a

infiltração dos microrganismos em estruturas superficiais dos mesmos, tornam difícil a sua total remoção (Almeida, 2005).

No entanto não são os perigos biológicos os únicos a comprometer a segurança do consumidor devido ao consumo de hortofrutícolas. Os perigos químicos também são uma realidade, devido a substâncias existentes nos próprios produtos (solanina nas batatas), a toxinas produzidas por fungos (aflatoxinas) e até pesticidas usados durante o crescimento dos produtos (Almeida, 2005). Em termos do acondicionamento e embalagem dos produtos hortofrutícolas, há ainda a considerar os perigos químicos associados aos produtos de limpeza e desinfecção das embalagens e das estruturas associadas ao transporte, armazenamento e comercialização. A não eliminação destes produtos nos processos de higienização, pode originar a contaminação química dos alimentos, a qual poderá ser tóxica por ingestão.

Os perigos físicos, por seu lado, são representados por corpos sólidos, estranhos aos produtos alimentares. As frutas e hortaliças que estão em maior contacto com o solo estão frequentemente contaminados com terra, pedras e insectos, mas estes são normalmente removidos durante a lavagem dos produtos antes da comercialização. No entanto terra e outros corpos estranhos aderem, por vezes, às embalagens de acondicionamento e transporte pelo que é importante controlar e higienizar as embalagens entre utilizações. Estes corpos estranhos podem estar presentes desde o início do acondicionamento mas podem também ser introduzidos de forma accidental na embalagem durante o armazenamento e manipulação, como é o caso de pregos ou agramos que se soltem das embalagens.

Desta forma alguns dos perigos físicos a considerar, e que podem resultar do contacto com a embalagem são (Almeida, 2005):

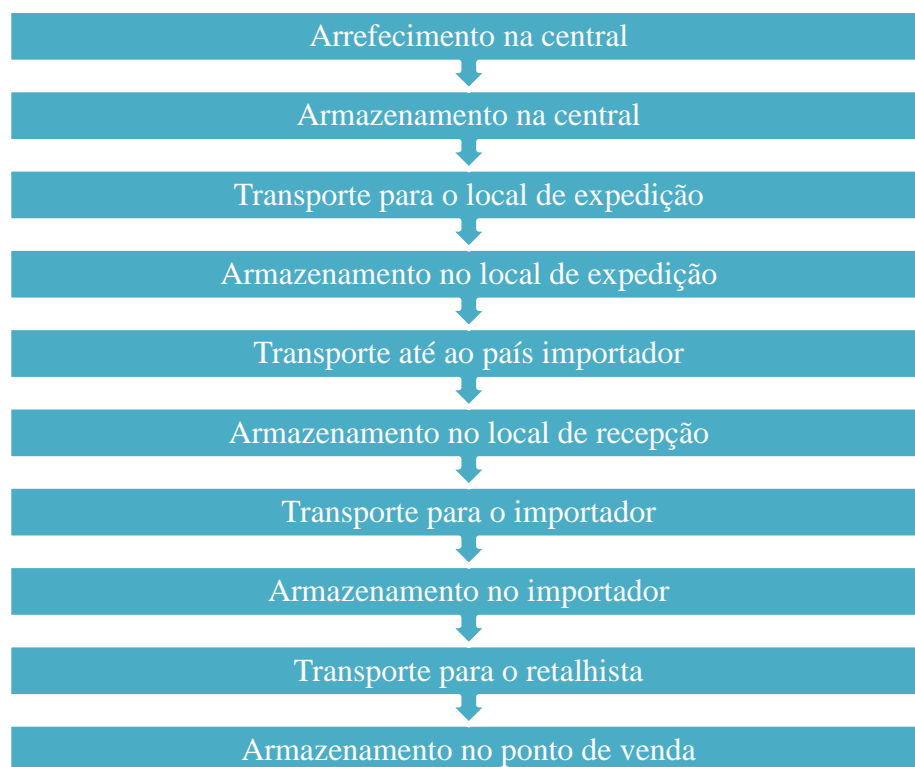
- peças metálicas (agramos, pregos)
- farpas de madeira
- porções de plástico, entre outros

Portanto, a correcta higienização das embalagens utilizadas no acondicionamento de produtos hortofrutícolas, entre utilizações, permite assegurar a diminuição da ocorrência dos perigos biológicos, químicos e físicos mencionados e representa, como tal, um factor essencial para garantir a segurança dos produtos acondicionados e do consumidor.

As embalagens contendo produtos hortofrutícolas até chegarem ao consumidor passam pelas fases indicadas na Fig. 2.22, considerando a sua cadeia mais longa e complexa, como no caso de trocas intercontinentais. Quando as caixas de madeira e de plástico são reutilizadas, é necessário acrescentar a estas fases o armazenamento das embalagens entre utilizações e a sua



higienização, bem como outros ciclos idênticos ao que consta na Fig. 2.22. Daí a importância a ter com as embalagens em todas as suas fases, pois a contaminação pode advir não só da própria embalagem, como também do alimento que transporta, do seu local de armazenamento e ainda da manipulação da embalagem durante o transporte, o armazenamento e a comercialização.



**Figura 2.22** - Representação esquemática de uma cadeia de abastecimento genérica de produtos hortofrutícolas exportados. (Almeida, 2005)

Existe um conjunto de princípios, que devem ser aplicados a qualquer tipo de embalagem utilizada no acondicionamento e distribuição de hortofrutícolas, de forma a evitar a contaminação e degradação prematura destes produtos (Camelo, 2004; Rapusar & Rolle, 2009):

- Todas as embalagens danificadas devem ser descartadas. Quer seja pela dificuldade que esse dano acrescenta ao processo de higienização, quer pela maior probabilidade de se soltarem pequenas partículas da embalagem durante o acondicionamento.
- As embalagens utilizadas no transporte de produtos frescos, como é o caso dos hortofrutícolas devem ser limpas e desinfectadas após cada utilização.

- Embalagens que estiveram em contacto directo com o solo, lama, matérias químicas ou fecais devem ser assinaladas e não voltar a ser utilizadas em processos subsequentes da distribuição de frutas e hortícolas.
- Da mesma forma, embalagens que tenham sido utilizadas para o transporte de outros produtos como pesticidas, combustíveis, entre outros materiais não devem ser reutilizadas no acondicionamento de hortofrutícolas.
- É importante a monitorização/controlo de pragas durante a inspecção às embalagens.
- As embalagens devem ser armazenadas em locais limpos, secos, onde os animais (como por exemplo, roedores) e insectos não possam ter acesso, e nunca próximo a áreas de armazenagem de agentes químicos. É importante que toda a área de armazenamento das caixas seja inspeccionada, incluindo o tecto do local.
- É recomendável que o armazenamento das caixas seja feito sobre paletes, de forma a evitar o contacto directo com o chão.

A forma como as embalagens são dispostas durante o armazenamento também influencia, em grande medida, a durabilidade dos produtos. Durante as operações de embalagem é importante evitar danificar os contentores: as caixas não devem empilhar-se de forma incorrecta, uma vez que este sistema pode danificar as embalagens e pode originar a contaminação dos produtos (Fig. 2.23). As forças aplicadas nas embalagens, durante toda a cadeia de distribuição conduzem a danos nestes produtos e diminuem o seu tempo de vida útil, pelo que estas devem ser desenhadas de forma a minimizar o impacto destas forças no seu conteúdo (Acican *et al*, 2006).



**Figura 2.23** - Exemplos de mau acondicionamento de embalagens contendo hortofrutícolas. (Camelo, 2004)

A higienização das embalagens pode ser efectuada recorrendo a métodos físicos ou químicos. Estes processos pretendem reduzir ao máximo o número de bactérias patogénicas, embora possam persistir alguns esporos. Estes últimos só são eliminados através de um processo de esterilização, como tratamentos a alta temperatura (Hernandez-Brenes, 2002).

A limpeza física das embalagens baseia-se em esfregar a mesma, de forma a soltar todas as partículas que tenham aderido à embalagem, enquanto a química inclui a utilização de detergentes de forma a remover a sujidade e resíduos de outros produtos. Estes métodos podem ser usados isolados ou combinados, para tentar obter uma melhor eficácia na limpeza. Os detergentes utilizados devem ser de solubilização rápida e completa, ter uma boa acção de humedecimento na área de aplicação, assim como uma grande dispersão, serem fáceis de enxaguar e serem de fácil acesso e utilização (Rapusar & Rolle, 2009).

Estes processos de limpeza podem não garantir, no entanto, a redução do número de microrganismos. A lavagem apenas elimina partículas contaminantes, como terra, restos dos produtos que estejam agregados às embalagens (gorduras, por exemplo), e pode diminuir fisicamente a carga microbiana. No entanto para uma higienização efectiva é necessário recorrer ao uso de desinfectantes, embora a lavagem e limpeza antes da desinfecção seja um passo importante, pois a presença de matéria orgânica e inorgânica pode afectar a acção dos agentes germicidas (Hernandez-Brenes, 2002). Estes são agentes anti-microbianos cuja função é eliminar ou reduzir o número de microrganismos, de forma a que estes não comprometam a saúde pública. Estes agentes de desinfecção podem ser de diferentes tipos,

sendo os mais comumente utilizados na desinfecção de superfícies em contacto com alimentos aqueles à base de cloro, iodo, compostos quaternários de amónio e ácidos e bases fortes (Hernandez-Brenes, 2002).

Em relação às embalagens, existem diferentes métodos que podem ser utilizados com vista à higienização. Um desses processos consiste na aplicação, através de *spray* a alta pressão, de água clorada, de forma a não só procurar remover todas as partículas que possam ter aderido à embalagem, como proceder à sua desinfecção. Outro método baseia-se em mergulhar as embalagens em tanques de água clorada a 43°C, por um tempo mínimo de dois minutos (Fig.2.24). Segundo Rapusas & Rolle (2009), uma lavagem à pressão efectuada de forma minuciosa é mais eficiente do que a imersão das caixas na água clorada.



**Figura 2.24** – Método de higienização de caixas de plástico, por imersão em água clorada  
(Rapusas & Rolle, 2009)

No entanto, os métodos de higienização não são igualmente eficazes para todos os tipos de embalagem. A utilização de antibacterianos de uso doméstico, para desinfecção de superfícies de corte e armazenamento de produtos alimentares, nem sempre é eficiente na remoção de contaminantes patogénicos. Segundo um estudo efectuado por DeVere & Purchase (2007), após imersão de superfícies contaminadas com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em solução antibacteriana, durante diferentes períodos de tempo (de 30 minutos a 120 minutos), verificou-se que a sobrevivência destes microrganismos era muito baixa nas superfícies de madeira e de plástico com Microban® incorporado, ao contrário do que ocorria nas superfícies de plástico e de vidro sem Microban®, onde os níveis eram bastante mais elevados, tendo sido efectivamente o plástico sem Microban®, o material onde a higienização foi menos eficaz.

Noutro estudo, na higienização de materiais de plástico e madeira contaminados com *Salmonella*, verificou-se que a desinfecção era claramente mais eficaz na remoção de *Salmonella* de superfícies de plástico do que nas de madeira (Gough & Dood, 1998), tendo-se atribuído esta diferença à menor capacidade de agregação do microrganismo ao plástico.

Estes resultados demonstram a dificuldade que pode representar o estabelecimento de um método eficiente de higienização para embalagens que transportam e acondicionam produtos hortofrutícolas, e que é o objecto de estudo deste trabalho.



### **3. Ensaio, Materiais e Métodos**

Este estudo pretende, por um lado, contribuir para o estabelecimento de uma metodologia eficaz na higienização de embalagens de madeira utilizadas no acondicionamento e transporte de hortofrutícolas e, por outro lado, por comparação com o plástico, verificar se a madeira é efectivamente um material de higienização mais difícil. Para tal foram realizadas contagens microbiológicas antes e após a higienização das embalagens, quer de madeira quer de plástico, tendo-se utilizado três métodos de higienização distintos – limpeza com água corrente, limpeza com água à pressão e limpeza com desinfectante diluído em água. Testaram-se, no estudo, estas três metodologias, pois são as que mais facilmente são aplicadas pelos operadores que utilizam as caixas de madeira e plástico no transporte e acondicionamento de produtos hortofrutícolas.

Tentou-se, ao longo do estudo, testar a metodologia que actualmente está implementada no MARL (Mercado Abastecedor da Região de Lisboa) para a higienização de caixas de plástico. Nesta metodologia as caixas são transportadas ao longo de um circuito por um sistema de tapetes rolantes. Nesse circuito, as caixas são lavadas com água contendo um desinfectante, a qual é aplicada por recurso a injectores. Quando as caixas a higienizar estão demasiado sujas (contendo muita terra ou outros resíduos), antes de serem introduzidas no circuito são lavadas com águas à pressão. No entanto, e apesar dos diversos esforços efectuados para testar esta metodologia, tal não foi possível por falta de resposta da Empresa que actualmente está a gerir este sistema.

No estudo, para cada metodologia ensaiada, efectuaram-se quatro amostragens distintas, em quatro dias diferentes, sendo testadas em cada amostragem cinco caixas de plástico e cinco caixas de madeira. Para cada caixa avaliou-se a contaminação microbiológica antes e após o processo de higienização efectuado, tendo-se efectuado duas recolhas por caixa. Portanto, para cada método de higienização testado obtiveram-se cerca de 40 amostras por tipo de material, 20 amostras colhidas antes da higienização e 20 amostras colhidas após a higienização, com duplicados. A contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C foi efectuada na totalidade das amostras (40 por material e método de higienização e respectivos duplicados). Em relação aos restantes parâmetros microbiológicos, a sua análise foi apenas efectuada em 16 amostras, por material e método de higienização (e respectivos duplicados). Ou seja, em cada amostragem, foram analisados os restantes parâmetros

microbiológicos em amostras obtidas em duas caixas de plástico e duas caixas de madeira, antes e após o processo de higienização efectuado.

No estudo foram utilizadas caixas que se encontravam em diversos armazéns associados a bares e cantinas da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL e que não tinham sido objecto de higienização prévia e tentou-se que fossem representativas dos materiais estudados, madeira e plástico, e da variedade de produtos hortofrutícolas habitualmente comercializados. As caixas de madeira utilizadas no estudo eram todas de madeira de pinho. Estas caixas tinham três dimensões diferentes:  $60 \times 40 \times 20 \text{ cm}^3$ ;  $50 \times 30 \times 15 \text{ cm}^3$ ;  $50 \times 30 \times 20 \text{ cm}^3$ . As caixas de plástico utilizadas no estudo eram de PP e de PEAD e tinham também dois tipos de dimensão:  $49 \times 49 \times 13,5 \text{ cm}^3$  e  $39 \times 29,5 \times 15,5 \text{ cm}^3$ .

O primeiro método testado baseou-se na higienização das embalagens de plástico e madeira, com água corrente (Fig. 3.1), processo muito utilizado no comércio a retalho antes da reutilização das mesmas. As embalagens contaminadas foram lavadas com água, proveniente da rede pública, com o auxílio de uma mangueira, até à remoção da “sujidade” visível possível. Em relação a este método, as amostragens foram realizadas nos dias 2, 9, 16 e 22 de Março de 2010.



**Figura 3.1** – Lavagem de caixa de plástico com água corrente

O segundo método aplicado na higienização das embalagens foi o da lavagem com água à pressão, processo esse também muito utilizado, quer pelo comércio a retalho, quer em mercados, feiras e outros. Neste método foi utilizada também água da rede pública, utilizando



uma mangueira com sistema de pressão acoplado (uma agulheta), tendo-se incidido a mesma nas embalagens até à remoção da “sujidade” visível possível. Em relação a este método, as amostragens foram realizadas nos dias 6, 12, 19 e 27 de Abril de 2010.

O terceiro método aplicado foi a utilização de um desinfectante comercial, tendo-se efectuado as amostragens nos dias 3, 17 e 31 de Maio e 14 de Junho de 2010. Neste método as embalagens foram lavadas, com o auxílio de uma esponja, com desinfectante bactericida comercial, utilizado para desinfecção de frutas e verduras, diluído em água de acordo com as instruções do rótulo (Fig. 3.2). As embalagens foram deixadas em contacto com o desinfectante durante 15 minutos. A substância activa utilizada na desinfecção foi o hipoclorito de sódio numa concentração de cerca de 0,23 g/litro (desinfectante diluído em água). Após a desinfecção, as embalagens foram lavadas com água corrente.



**Figura 3.2** – Lavagem de caixa de plástico com desinfectante diluído em água

Para avaliação dos métodos de higienização estudados foi avaliada a contaminação microbiológica das caixas antes e após a aplicação dos processos de limpeza e desinfecção. A recolha e preparação das amostras e a análise da flora microbiana foram realizadas nas instalações da FCT-UNL, em particular no laboratório de microbiologia do GDEH.

### **3.1 Métodos**

A recolha das amostras para a análise microbiológica, antes e após o processo de higienização, foi efectuada de acordo com a NP 1828, utilizando para tal aparelhos e

utensílios de material inerte, limpo e esterilizado. As colheitas foram efectuadas com os indispensáveis cuidados de assepsia e de modo a que representem devidamente as características microbiológicas das superfícies das caixas de hortofrutícolas a analisar.

As amostras foram colhidas pela técnica da zaragatoa de acordo com o procedimento descrito na Decisão da Comissão 2001/471/CE. De acordo com este procedimento, as zaragatoas de algodão, esterilizadas, foram humedecidas antes da recolha das amostras em caldo Triptonasal (0,1% Triptona (Becton, Dickinson and Company) + 0,85% NaCl), durante não menos de 5 segundos, e depois esfregada verticalmente, horizontalmente e na diagonal, durante no mínimo 20 segundos, numa área representativa da superfície da embalagem. A área de amostragem para o esfregaço abrangeu pelo menos 100 cm<sup>2</sup> por local de amostragem (Fig. 3.4). Após a utilização da zaragatoa húmida, repetiu-se o processo de amostragem com uma zaragatoa seca. Ambas as zaragatoas foram recolhidas para um frasco contendo 50 ml de Triptonasal.



**Figura 3.3** – Zaragatoa efectuada a uma embalagem de plástico após o processo de lavagem e desinfecção.

Todas as amostras foram examinadas num espaço de tempo inferior a 24 horas, tendo sido conservadas entre 0-4°C, tal como estipulado na NP 1828. A preparação das amostras foi efectuada de acordo com a NP 1829, tendo-se utilizado aparelhos e utensílios de material inerte, limpo e esterilizado. De acordo com a NP 1829, a preparação das amostras foi efectuada de modo a conduzir a uma perfeita uniformidade da distribuição dos microrganismos e com os indispensáveis cuidados de assepsia de modo a evitar qualquer contaminação.

Na aplicação das metodologias a seguir descritas e na quantificação microbiana utilizaram-se as seguintes referências normativas:

NP 2079, a qual descreve as regras gerais para análise microbiológica, a EN ISO 6887-1, a qual descreve as regras gerais para a preparação da suspensão inicial e das diluições decimais, a ISO 8199, a qual descreve as regras gerais para a contagem de microrganismos e a ISO/TS

11133-1 e ISO/TS 11133-2, as quais descrevem as regras gerais na preparação e produção de meios de cultura.

Para determinar a contaminação das embalagens, ao nível microbiológico, escolheram-se os microrganismos que são habitualmente identificados com mais frequência em produtos hortofrutícolas bem como os que podem resultar do manuseamento das embalagens pelos operadores e pelas suas condições de utilização, de acordo com Adams e Moss (1997).

Assim, efectuaram-se as seguintes determinações nas amostras: contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C, contagem de bolores e leveduras a 25°C e a 37°C, contagem de bactérias coliformes, contagem de enterococos, contagem de *Escherichia coli*, contagem de *Clostridium perfringens*, contagem de *Pseudomonas* e contagem de *Bacillus cereus*.

#### **3.1.1 Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 36°C (ISO 6222:1999)**

Sementeira por incorporação de determinada quantidade da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (meio Plate Count Agar, Becton, Dickinson and Company). Incubação das placas semeadas, durante  $44 \pm 4$  h à temperatura de  $36 \pm 2$  °C e durante  $68 \pm 4$  h à temperatura de  $22 \pm 2$  °C, em aerobiose. Cálculo do número de microrganismos por  $\text{cm}^2$ , a partir do número de colónias desenvolvidas nas placas seleccionadas. Nota: como uma das estufas do laboratório se encontrava a 37°C foi esta a temperatura utilizada nos ensaios.

#### **3.1.2 Contagem de bolores e leveduras a 25°C (NP 3277-1:1987)**

Sementeira em superfície de uma quantidade determinada da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (meio Cooke Rose Bengal, Biokar Diagnostics, contendo clorotetraciclina). Incubação das placas semeadas, durante  $120 \pm 2$  h à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, em aerobiose. Cálculo do número de microrganismos por  $\text{cm}^2$ , a partir do número de colónias desenvolvidas nas placas seleccionadas.

#### **3.1.3 Contagem de bolores e leveduras a 37°C (NP 3277-2:1987)**

Sementeira em superfície de uma quantidade determinada da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (meio Cooke Rose Bengal, Biokar Diagnostics, contendo clorotetraciclina). Incubação das placas semeadas, durante  $72 \pm 2$  h à temperatura de  $37 \pm 1$  °C, em aerobiose. Cálculo do número de microrganismos por  $\text{cm}^2$ , a partir do número de colónias desenvolvidas nas placas seleccionadas.

### **3.1.4 Contagem de bactérias coliformes (ISO 4831:2006)**

Tubos contendo caldo verde brilhante (Himedia), meio selectivo confirmativo da presença de bactérias coliformes, com tubos de Durham no seu interior, foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. Os tubos de fermentação inoculados foram incubados a  $30 \pm 1$  °C. Após  $24 \pm 2$  h e  $48 \pm 4$  h de incubação consideram-se positivos os tubos em que se nota turvação e formação de gás no tubo de Durham, devendo o gás atingir pelo menos 1/10 da altura do tubo. O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por  $\text{cm}^2$  é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva.

### **3.1.5 Contagem de *Escherichia coli***

Seguindo a metodologia indicada na NP 2308 (1986), foi efectuada a repicagem, a partir de cada um dos tubos de verde brilhante que deram resultado positivo na pesquisa e contagem de bactérias coliformes, de uma ansa com cultura para caldo verde brilhante e outra para água peptonada (1% Peptona (Becton, Dickinson and Company) + 0,5% NaCl). Incubação em banho de água a  $44,5 \pm 0,5$  °C durante  $48 \pm 2$  h. Verificação de produção de gás no meio de cultura de verde brilhante (mínimo 1/10 do tubo de Durham) e de produção de indol na água peptonada (formação de um anel sobrenadante vermelho, após adição de cerca de 1 ml de reagente de Kovacs, seguido de agitação e repouso). Consideram-se positivos para a presença de *Escherichia coli* os tubos que apresentam resultados positivos simultaneamente nos dois testes atrás indicados.

O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por  $\text{cm}^2$  de amostra é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva, tal como descrito na ISO 8199 (2005).

Para a contagem de *E. coli*, não foi utilizada a metodologia indicada no Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão e indicada na norma ISO 16649-2 (2001), mas sim o método descrito, que apresenta resultados comparáveis aos resultados obtidos pela metodologia indicada pelo Regulamento nº 1441/2007 (Abrantes, 2008).

### **3.1.6 Contagem de Enterococos (ISO 7899-1: 1998)**

Uma série de tubos contendo caldo de dextrose de azida (Becton, Dickinson and Company), presumptivo da presença de Enterococos, foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. Os tubos de fermentação inoculados

foram incubados a  $37 \pm 1$  °C. Após  $48 \pm 3$  h de incubação consideram-se positivos os tubos que apresentam turvação.

Repicagem, a partir de cada um dos tubos anteriores, que deram resultado positivo presuntivo, de uma ansa com cultura para caldo EVA (Azida de Violeta de Etilo, Biokar Diagnostics) confirmativo da presença de Enterococos. Incubação a  $37 \pm 1$  °C durante  $48 \pm 3$  h. A turvação do meio e/ou a formação de um depósito de cor azul-arroxeadada no fundo do tubo indicam uma reacção positiva, confirmando a presença de Enterococos. O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por  $\text{cm}^2$  de amostra é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva.

### 3.1.7 Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (Dutka, 1978)

Uma série de tubos contendo meio de asparagina modificado, presumptivo da presença de *Pseudomonas aeruginosa*, foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. Este meio de cultura não está disponível na forma desidratada tendo sido necessária a sua preparação. O meio de asparagina modificado tem a seguinte composição:

Asparagina, L (-)	2,0 g
Prolina, L (-)	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,0 g
Etanol	26 ml
Água Destilada	1000 ml

$$\text{pH} = 7.0 \pm 0,2$$

Depois de preparado, o meio foi distribuído em tubos e esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

Os tubos inoculados foram incubados a  $44,5 \pm 0,5$ °C, durante 8 – 10 dias. A turvação do meio e/ou a formação de uma fina película superficial, constituem uma reacção positiva, de presumptiva de *Pseudomonas aeruginosa*.

O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por  $\text{cm}^2$  de amostra é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva.

### **3.1.8 Contagem de *Clostridium perfringens* (Fernando, 1996)**

Uma série de tubos contendo “Litmus Milk” (Becton, Dickinson and Company), presuntivo da presença de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras - *Clostridia*, foram inoculados com quantidades apropriadas da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais. A cada tubo foi adicionada parafina líquida, de modo a garantir condições de anaerobiose na cultura. Os tubos inoculados foram incubados a  $37 \pm 1$  °C. Após  $48 \pm 3$  h de incubação consideram-se positivos os tubos que apresentam o meio hidrolisado (com aspecto “talhado”) e com alteração da cor de lilás para rosa e creme.

O cálculo do número mais provável (NMP) de organismos por  $\text{cm}^2$  de amostra é estimado a partir do número e da distribuição de tubos que apresentam reacção positiva.

### **3.1.9 Contagem de *Bacillus cereus* (National Standard Method F15i1.4, 2005)**

Sementeira em superfície de 0,1 ml da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais, em meio de cultura apropriado (*Bacillus cereus* Agar, de acordo com Mossel, Biokar Diagnostics, contendo gema de ovo e polimixina B). Incubação das placas semeadas, entre 24 e 48 h à temperatura de  $30 \pm 1$  °C, em aerobiose. A partir de cada placa foram seleccionadas as colónias características (colónias de cor rosa, rodeadas por um precipitado) para confirmação. Cada colónia seleccionada foi inoculada em meio de nitratos (0,5% de peptona (Becton, Dickinson and Company) + 0,3% extracto de carne (Becton, Dickinson and Company) + 0,1%  $\text{KNO}_3$ ). Os tubos foram incubados a  $30 \pm 1$  °C, durante  $22 \pm 2$  h. Consideram-se como positivos os tubos que apresentam a cor vermelha após adição de 0,2 ml da seguinte mistura: reagente A:Reagente B, 1:1. Reagente A, ácido 5-amino-2-naftaleno-sulfónico 0,1% em ácido acético 15% (v/v). Reagente B, ácido sulfanílico, 0,4% em ácido acético 15% (v/v).

Cálculo do número de microrganismos por  $\text{cm}^2$ , a partir do número de colónias características desenvolvidas nas placas seleccionadas.

Em todas as metodologias, os reagentes químicos usados tinham grau de pureza analítico.

## **3.2 Análise estatística**

Para uma correcta interpretação dos resultados, nomeadamente a verificação do nível de significância das diferenças obtidas, foi efectuada uma Análise de variância – ANOVA, recorrendo-se ao Microsoft® Office Excel 2007. Esta análise foi efectuada para cada um dos

parâmetros em estudo, tendo-se analisado as diferenças entre o tipo de embalagem utilizada, madeira e plástico, entre os métodos de limpeza aplicados (água corrente, água à pressão e desinfectante) e para cada método, entre a contaminação verificada antes e depois da limpeza e desinfecção, entre outras análises.





## 4. Apresentação e Discussão de Resultados

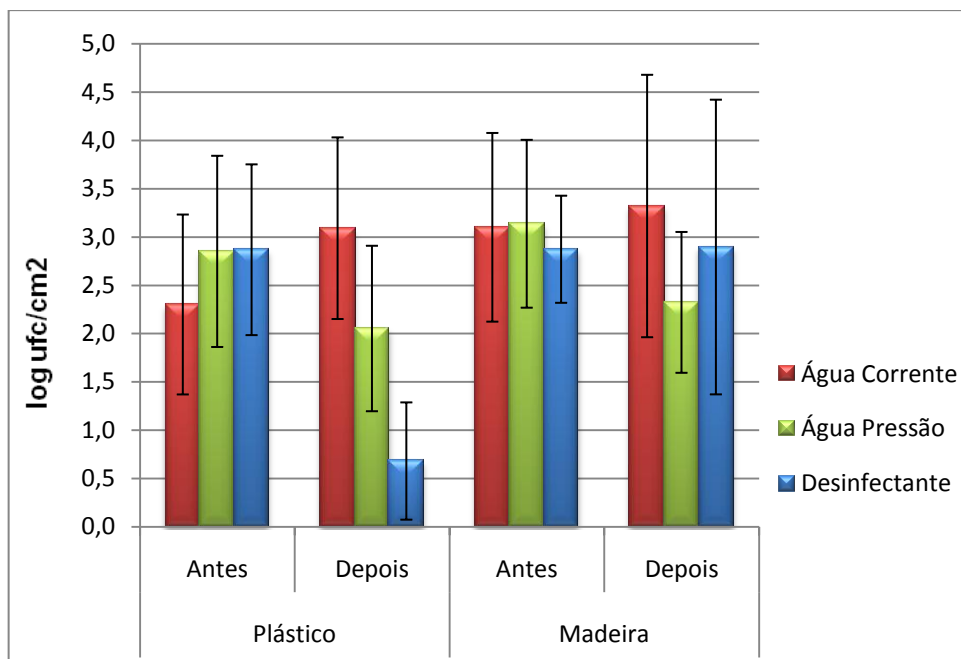
### 4.1 Microrganismos totais viáveis a 22°C e a 37°C

Os resultados obtidos referentes à contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C e a 37°C, em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização são apresentados nos Quadros 4.1 e 4.2 e nas Figuras 4.1 e 4.2.

**Quadro 4.1** – Contagem de microrganismos totais viáveis a 37°C (log ufc/cm<sup>2</sup>) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfetante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	0,4	1,4	0,8	2,3	1,6	0,8	1,7	2,6	1,3	0,9	1,8	0,1
	2,3	1,0	2,3	1,1	1,9	0,1	2,3	1,5	2,4	0,4	2,3	<-0,8
	0,3	1,3	3,5	2,3	2,4	0,6	2,8	2,0	1,7	0,2	2,4	3,2
	1,4	1,6	1,9	2,4	0,5	1,5	2,6	0,8	2,2	-0,5	2,4	3,4
	0,6	0,8	1,4	1,5	0,8	0,6	2,7	2,0	1,5	-0,5	2,3	2,8
2ª colheita	2,9	3,3	1,4	3,9	1,7	<-0,8	0,8	1,2	2,3	0,8	3,1	0,1
	3,0	4,2	3,5	4,3	2,0	0,6	1,4	1,0	2,4	0,7	1,7	1,1
	2,0	3,5	2,5	3,5	1,5	0,3	2,1	1,2	1,0	<-0,8	2,4	-0,3
	2,8	2,8	3,5	3,3	0,5	0,5	1,6	1,4	2,2	-0,5	2,4	0,6
	2,4	2,9	2,1	3,7	0,5	0,6	1,3	0,6	0,3	0,1	1,7	<-0,8
3ª colheita	1,4	1,1	0,8	<-0,8	3,7	1,9	1,7	2,4	2,1	1,1	2,6	3,2
	1,6	1,4	1,1	0,1	3,9	1,6	2,8	2,0	2,3	1,1	3,1	3,2
	0,5	1,3	2,2	1,2	2,0	1,5	4,0	2,8	4,0	0,4	3,2	2,2
	0,5	1,7	1,1	0,3	1,9	2,0	3,6	2,3	2,2	0,2	2,7	2,1
	0,5	1,0	0,9	0,3	1,7	3,3	2,7	2,4	2,1	1,4	3,9	3,5
4ª colheita	1,7	1,5	2,0	1,7	0,9	1,7	1,8	1,7	3,3	0,5	2,5	1,2
	1,4	2,1	4,1	3,1	1,2	1,0	2,0	2,9	1,4	1,0	2,1	3,2
	1,8	1,7	2,7	2,3	2,0	0,7	4,0	3,1	0,6	0,2	2,1	2,8
	0,8	1,8	2,3	1,8	0,9	0,9	2,3	1,3	2,6	0,1	1,9	3,3
	2,8	1,8	2,3	1,7	0,1	0,7	1,7	1,3	3,3	0,1	2,0	2,7

**Nota:** A – Antes da Higienização; D – Depois da Higienização



**Figura 4.1** – Valores médios e desvio padrão da contagem de microrganismos totais viáveis a 37°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.

Por observação do Quadro 4.1 e Figura 4.1 pode verificar-se que a lavagem das embalagens com água corrente não revela qualquer acção de limpeza, quer nas embalagens de madeira quer nas embalagens de plástico. Tal facto é sustentado estatisticamente (ANOVA, 2 entradas), uma vez que não se verificaram diferenças significativas ao nível de contaminação, antes e após as lavagens ( $p=0,51$ ) para os dois tipos de materiais. Verifica-se, até, um aumento da contaminação após a lavagem (em média), o qual não é estatisticamente significativo. Apesar das embalagens de madeira apresentarem, em média, um valor de germes a 37°C superior ao das embalagens de plástico, a análise estatística revela que não existem diferenças significativas entre o nível de contaminação das embalagens de madeira e de plástico, quer antes da lavagem quer depois da lavagem ( $p=0,18$ ).

No que respeita à acção da água à pressão na limpeza das embalagens, verifica-se uma diminuição da contagem de germes após a lavagem, a qual é, globalmente, estatisticamente significativa ( $p=0,010$ ). No entanto, se considerarmos apenas as embalagens de plástico ou apenas as embalagens de madeira, a redução da contaminação devido à lavagem com água à pressão não tem significado estatístico (plástico:  $p=0,065$  e madeira:  $p=0,075$ ). Verificam-se diferenças significativas entre materiais ( $p=0,00025$ ), uma vez que as embalagens de madeira apresentaram uma contaminação superior à das embalagens de plástico.

Em relação à lavagem das embalagens com a solução desinfectante, e por observação do Quadro 4.1 e da Figura 4.1, é possível constatar que há uma diminuição significativa da

contagem de germes totais, o que se confirma pela análise estatística ( $p=1,1 \times 10^{-6}$ ). Esta redução é muito significativa nas embalagens de plástico ( $p=1,5 \times 10^{-8}$ ) mas não tem significado estatístico nas embalagens de madeira ( $p=0,15$ ). Obtiveram-se diferenças significativas entre materiais de embalagem em termos da contaminação com germes a 37°C ( $p=1,3 \times 10^{-5}$ ), tendo-se observado uma contaminação estatisticamente superior nas embalagens de madeira face às embalagens de plástico. No entanto, esta diferença entre embalagens é apenas significativa após a lavagem com a solução desinfetante ( $p=4,8 \times 10^{-5}$ ). Antes da lavagem a diferença na contaminação entre embalagens não foi significativa ( $p=0,13$ ).

Comparando os três tipos de lavagem, verifica-se que a lavagem com a solução desinfetante é a mais eficaz na remoção dos germes a 37°C, mas apenas nas embalagens de plástico. No plástico, verificaram-se diferenças significativas entre os métodos de lavagem ( $p=0,019$ ): a água corrente não elimina os germes, a água à pressão diminui a contaminação, mas não de uma forma estatisticamente significativa, sendo a solução desinfetante o único método a produzir resultados de significativa diminuição da contaminação. Nas embalagens de plástico verifica-se, então, que a contagem de germes a 37°C é significativamente mais reduzida após a lavagem ( $p=0,00015$ ), sobretudo quando é utilizada a solução desinfetante.

Já em relação às embalagens de madeira não se verificaram diferenças significativas, quer entre metodologias de higienização ( $p=0,85$ ) quer em relação às diferenças, na contagem dos germes, antes e após o processo de limpeza ( $p=0,078$ ). A higienização das embalagens de madeira não foi, portanto, eficaz, com nenhum dos métodos utilizados.

Por observação e comparação dos resultados apresentados nos Quadros 4.1 e 4.2 e nas Figuras 4.1 e 4.2, verifica-se que os valores das contagens de germes a 22°C são significativamente superiores aos valores obtidos a 37°C ( $p=0,039$ ). Este resultado está em conformidade com o que foi obtido por Abrantes (2008) e também com o que seria esperado, uma vez que a maioria dos microrganismos presentes nos produtos hortofrutícolas e que podem contaminar estas embalagens, são microrganismos psicrófilos e mesófilos (Babesí *et al.*, 2006; Abadias *et al.*, 2008).

No que respeita à lavagem com água corrente, esta não se revela um método eficaz, quer nas embalagens de plástico quer nas embalagens de madeira, em termos da remoção de germes a 22°C. Com efeito, embora a lavagem reduza a contaminação (Quadro 4.2 e Figura 4.2), esta diminuição não é estatisticamente significativa ( $p=0,78$ ). As embalagens de madeira

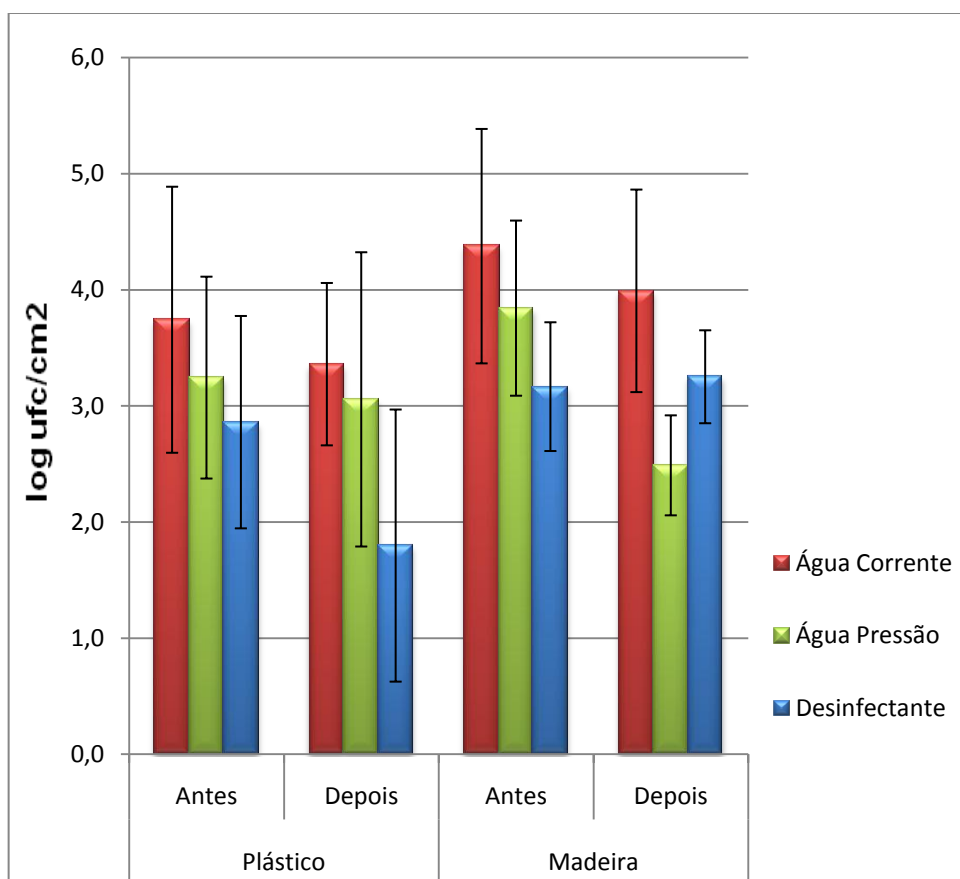
apresentaram uma contaminação significativamente superior à das embalagens de plástico ( $p=0,0017$ ).

**Quadro 4.2** - Contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C (log ufc/cm<sup>2</sup>) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfetante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	2,3	2,0	2,2	3,5	2,2	2,1	3,3	2,6	0,8	1,6	2,9	2,3
	3,6	2,6	2,4	2,2	1,8	1,9	3,3	2,6	2,4	<-0,8	3,1	2,3
	3,0	2,2	4,9	3,1	2,4	1,8	3,6	2,3	1,9	<-0,8	2,8	3,2
	3,1	2,4	2,5	3,4	1,0	3,5	3,2	2,6	2,6	<-0,8	3,3	3,3
	3,2	2,8	2,6	3,8	1,7	1,8	3,4	2,2	1,3	<-0,8	3,0	3,4
2ª colheita	5,0	3,4	4,3	4,1	1,6	<-0,8	1,8	2,6	2,1	0,4	3,1	3,1
	3,5	4,2	3,7	5,1	1,9	<-0,8	2,3	2,9	2,6	0,1	2,4	3,3
	2,8	3,9	5,3	3,5	1,9	1,1	2,9	2,5	0,9	-0,2	2,9	2,9
	1,9	4,0	4,6	4,6	3,4	3,4	2,7	2,5	2,5	-0,2	2,8	2,5
	2,9	3,5	3,9	3,6	3,4	3,9	2,7	2,4	0,5	<-0,8	2,1	2,6
3ª colheita	0,8	2,3	2,6	2,4	3,8	3,2	2,9	2,7	2,6	0,6	2,6	3,7
	2,3	2,8	3,2	1,4	4,0	3,4	3,6	2,3	3,2	2,4	3,4	3,5
	2,1	2,3	4,6	3,0	2,4	2,7	4,4	2,5	3,8	2,1	3,6	3,1
	1,0	1,9	2,6	2,4	2,2	2,4	4,7	2,3	2,7	1,3	2,8	3,0
	0,8	1,9	2,6	1,9	1,9	3,3	3,4	2,7	2,6	1,3	4,1	3,5
4ª colheita	1,6	2,4	2,1	2,8	2,9	3,0	2,7	1,6	3,3	2,8	2,7	3,1
	0,8	2,5	4,7	3,0	3,4	2,4	2,3	2,7	1,3	1,2	2,9	3,3
	3,5	2,9	3,3	2,6	3,9	1,8	4,5	2,2	1,1	1,4	2,1	3,1
	1,0	2,5	3,2	3,0	3,2	1,9	3,0	1,0	2,7	1,2	2,2	3,7
	2,9	3,2	3,5	2,8	2,2	2,3	2,6	2,0	2,9	1,6	2,2	3,3

**Nota:** A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem

Na lavagem com água à pressão (Quadro 4.2 e Figura 4.2), obteve-se uma redução significativa dos valores referentes à contagem de germes a 22°C ( $p=0,0043$ ), mas estatisticamente, esta redução só tem significado nas embalagens de madeira ( $p=0,00015$ ). Nas embalagens de plástico a redução da contaminação não foi significativa ( $p=0,41$ ). Na lavagem com água à pressão, não se observaram diferenças significativas entre as embalagens de plástico e de madeira em termos de contaminação ( $p=0,069$ ), principalmente após a lavagem ( $p=0,83$ ), pois antes da lavagem as embalagens de madeira apresentavam uma contaminação estatisticamente superior à das embalagens de plástico ( $p=0,022$ ).



**Figura 4.2** - Valores médios e desvio padrão da contagem de microrganismos totais viáveis a 22°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.

A utilização da solução desinfectante, por seu lado, tem uma acção de limpeza comprovada, uma vez que há uma redução significativa nos valores das contagens devido à higienização ( $p=0,0044$ ). No entanto, esta lavagem apenas reduz significativamente a contaminação nas embalagens de plástico ( $p=0,00021$ ). Nas embalagens de madeira, a variação não teve significado estatístico ( $p=0,074$ ).

Na lavagem com a solução desinfectante, observaram-se diferenças significativas, entre materiais de embalagem, em termos da contaminação com germes a 22°C ( $p=6,1 \times 10^{-13}$ ). As embalagens de madeira apresentaram uma contaminação significativamente superior à das embalagens de plástico, quer antes, quer após a lavagem.

Nas embalagens de plástico, tal como nas contagens efectuadas a 37°C, verificaram-se diferenças significativas entre métodos de lavagem ( $p=8,1 \times 10^{-6}$ ) nas contagens efectuadas a 22°C. Para este material, a lavagem com a solução desinfectante revelou-se a mais eficaz na remoção dos germes a 22°C. Com efeito, estatisticamente, não se observaram diferenças

significativas na contaminação antes e após a higienização ( $p=0,057$ ), excepto quando foi utilizada a solução desinfectante, a qual implicou a redução significativa dos germes a 22°C ( $p=0,00021$ ).

Em relação à higienização das embalagens de madeira obtiveram-se diferenças significativas entre os métodos utilizados ( $p=0,0064$ ). A lavagem à pressão foi a mais eficaz na redução da contaminação a 22°C. Nas embalagens de madeira obteve-se uma redução estatisticamente significativa dos germes a 22°C após a higienização ( $p=0,022$ ), sobretudo quando foi aplicada a lavagem à pressão.

Para verificação da limpeza e desinfecção, compararam-se os resultados obtidos após a higienização com os valores indicados na Decisão da Comissão 2001/471/CE. Embora os critérios expostos nesta Decisão sejam referentes ao controlo que deve ser efectuado em matadouros e instalações de desmancha, em matéria de limpeza e desinfecção, na falta de outros indicadores serão utilizados estes na avaliação da limpeza e desinfecção das caixas. De acordo com esta Decisão, são considerados resultados aceitáveis valores de contagens totais viáveis a 37°C cuja média seja inferior ou igual a 1 log ufc/cm<sup>2</sup>. Este valor limite que define a aceitabilidade da contaminação de superfícies, após higienização, é igualmente utilizado como critério no trabalho de Lehto *et al.* (2010). O mesmo valor limite foi utilizado como critério para os germes a 22°C de forma a poder avaliar a eficiência da limpeza das caixas.

Desta forma, e utilizando este valor como critério, apresentam-se no Quadro 4.3 a percentagem de resultados considerados aceitáveis, após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de totais viáveis a 37°C e a 22°C.

**Quadro 4.3** - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de totais viáveis a 37°C e a 22°C.

	Lavagem com água corrente		Lavagem com água à pressão		Lavagem com solução desinfectante	
	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira
<b>Contagem de totais viáveis a 37°C</b> ( $n = 20$ )	15	20	65	15	85	30
<b>Contagem de totais viáveis a 22°C</b> ( $n = 20$ )	0	0	10	5	50	0

Nota: Resultados aceitáveis,  $\leq 1$  log ufc/cm<sup>2</sup>

Os resultados apresentados indicam que os métodos de higiene e desinfecção utilizados não são eficientes na eliminação dos germes, pois nenhuma das metodologias apresentou 100% de resultados aceitáveis. Em termos de remoção de germes, verifica-se que se obtiveram mais resultados aceitáveis (em %) nas contagens de totais viáveis a 37°C do que nas contagens de totais viáveis a 22°C. Significa, portanto, que a remoção, a níveis aceitáveis, de totais viáveis a 22°C das caixas, foi mais difícil, talvez porque as caixas apresentavam uma contaminação de germes a 22°C superior à contaminação com germes a 37°C.

Comparando as três metodologias, verifica-se que a metodologia mais eficaz na higienização (pois apresentou uma maior percentagem de resultados aceitáveis) foi a lavagem com solução desinfetante, principalmente nas embalagens de plástico. Os resultados indicam também que a higienização das caixas de madeira foi mais difícil do que a higienização das caixas de plástico. Com efeito, as embalagens de plástico, globalmente, apresentaram uma maior percentagem de resultados aceitáveis do que as embalagens de madeira. Estes resultados corroboram o que está indicado em Revol-Junelles *et al.* (2005), que refere a existência de deficientes métodos de limpeza e higienização para a madeira. No entanto, estes resultados mostram também que a higienização das caixas de plástico, com os métodos aplicados, não é totalmente eficaz, mesmo no caso da aplicação da solução desinfetante.

#### **4.2 Bolores e Leveduras a 37°C e 25°C**

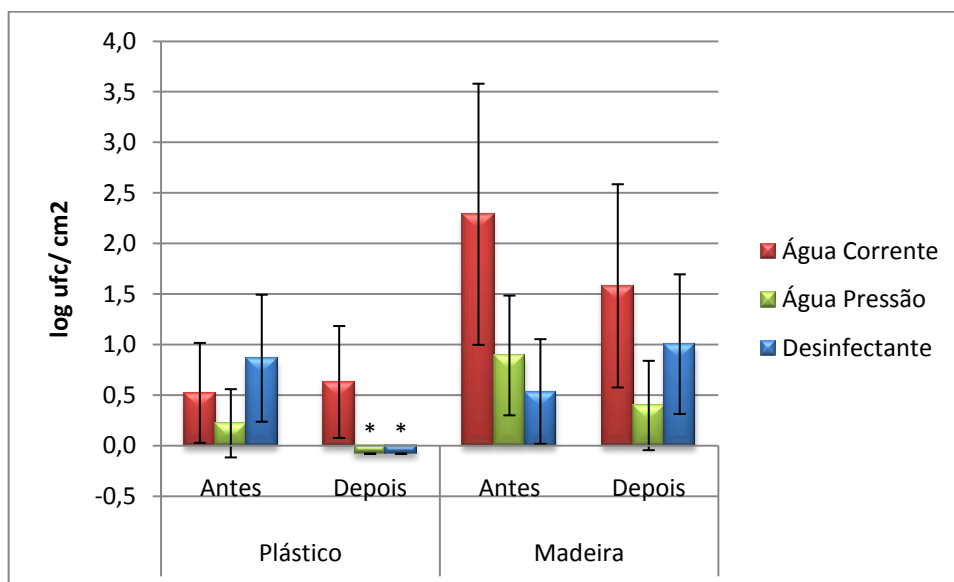
Os resultados obtidos na contagem de Bolores e Leveduras a 37°C e 25°C, no plástico e na madeira, antes e após os três métodos de higienização são apresentados nos Quadros 4.4 e 4.5 e Figuras 4.3 e 4.4.

No que respeita à contaminação por bolores e leveduras, a 37°C, por observação do Quadro 4.4 e Figura 4.3, pode constatar-se que a lavagem com água corrente não foi eficaz na remoção de bolores e leveduras, em ambos os materiais, dado que não se observaram diferenças significativas na contaminação antes e após o processo de limpeza ( $p=0,69$ ). Não se observaram também diferenças significativas entre as embalagens de madeira e de plástico em termos de contaminação ( $p=0,32$ ), quer antes quer depois da higienização.

**Quadro 4.4** - Contagem de Bolores e Leveduras a 37°C (log ufc/cm<sup>2</sup>) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.

	Lavagem com Água corrente				Lavagem com Água à pressão				Lavagem com Solução desinfectante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	0,9	<-0,1	0,9	<-0,1	<-0,1	<-0,1
	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	1,5	<-0,1	0,9	<-0,1	0,9	<-0,1
2ª colheita	0,9	1,2	2,4	1,7	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1
	0,9	0,9	0,9	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1
3ª colheita	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	0,9	<-0,1	<-0,1	<-0,1	0,8	<-0,1	<-0,1	<-0,1
	0,9	0,9	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	0,9	<-0,1	<-0,1	<-0,1	1,2	1,9
4ª colheita	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1	0,9	0,9	1,5	<-0,1	<-0,1	<-0,1
	<-0,1	<-0,1	3,1	2,4	<-0,1	<-0,1	0,9	0,9	<-0,1	<-0,1	<-0,1	<-0,1

Nota: A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem



**Figura 4.3** - Valores médios e desvio padrão da contagem de bolores e leveduras a 37°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. **Nota:** as colunas marcadas com asterisco, representam o limite de detecção do método, uma vez que não foram detectadas, em nenhuma amostra, colónias de bolores e leveduras.



Quer nas embalagens de madeira, quer nas embalagens de plástico, como resultado da lavagem com água à pressão, observou-se uma diminuição na contaminação com bolores e leveduras (Quadro 4.4 e Figura 4.3), a 37°C, mas esta diminuição não foi estatisticamente significativa ( $p=0,064$ ). Por análise do Quadro 4.4 e Figura 4.3, verifica-se que nas embalagens de plástico, após a lavagem com água à pressão, não foram detectadas colónias de bolores e leveduras. Isto significa que estas embalagens estavam devidamente higienizadas face a estes organismos. Neste caso, a diminuição não teve significado porque a contaminação nas caixas antes da higienização era muito reduzida. Com efeito, apenas uma caixa apresentou contaminação com bolores e leveduras (Quadro 4.4). A análise estatística dos resultados indica que as embalagens de madeira se encontravam significativamente mais contaminadas em bolores e leveduras, a 37°C, do que as embalagens de plástico ( $p=0,010$ ), principalmente antes da lavagem com água à pressão ( $p=0,038$ ). Após a lavagem, a diferença na contaminação em bolores e leveduras, a 37°C, não apresentou significado estatístico entre embalagens de madeira e plástico ( $p=0,15$ ).

A aplicação de desinfectante não revelou eficácia na higienização das caixas, em termos de remoção de bolores e leveduras a 37°C, dado que não se observaram diferenças significativas nos resultados obtidos antes e depois da higienização ( $p=0,15$ ). No entanto, particularizando entre materiais, verifica-se que a utilização do desinfectante, reduz a contaminação com bolores e leveduras no plástico, de uma forma significativa ( $p=0,027$ ), ao contrário do que ocorre na madeira ( $p=0,93$ , Quadro 4.4 e Figura 4.3). Tal como observado na lavagem com água à pressão, por análise do Quadro 4.4 e Figura 4.3, verifica-se que nas embalagens de plástico, após a lavagem com desinfectante, não foram detectadas colónias de bolores e leveduras. Isto significa que estas embalagens estavam devidamente higienizadas face a estes organismos. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre materiais ( $p=0,97$ ) em termos de contaminação com bolores e leveduras a 37°C, quer antes quer depois da higienização.

Comparando a acção dos três métodos de limpeza, no plástico, pode constatar-se que o desinfectante é o único método que, efectivamente, diminui, com significado, a contaminação por bolores e leveduras, a 37°C. Após a utilização de água corrente, não ocorreu variação nas contagens (pelo contrário, até há um aumento, embora sem significado estatístico). A utilização de água à pressão também não fez decrescer, significativamente, a contaminação inicial. Como já mencionado, neste caso, a diminuição pode não ter tido significado porque a

contaminação nas caixas antes da higienização era muito reduzida. Estatisticamente, não se verificaram diferenças significativas entre métodos de higienização ( $p=0,11$ ), assim como, globalmente, não se registaram diferenças significativas na contaminação em bolores e leveduras, a 37°C, antes e após as lavagens ( $p=0,090$ ). Como já referido anteriormente, apenas a utilização da solução desinfetante reduziu eficazmente a contaminação com bolores e leveduras no plástico, de uma forma significativa ( $p=0,027$ ).

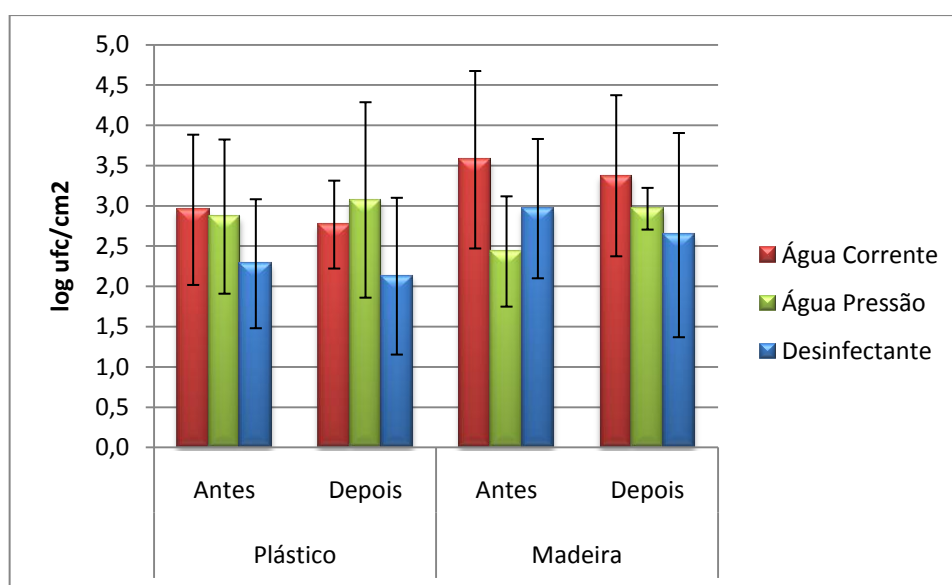
Em relação à higienização das embalagens de madeira, nenhum dos métodos utilizados foi eficaz. Estatisticamente, não se observaram diferenças significativas entre métodos de higienização ( $p=0,35$ ), e entre as contagens de bolores e leveduras, a 37°C, antes e após a aplicação da higienização ( $p=0,29$ ).

**Quadro 4.5** - Contagem de Bolores e Leveduras a 25°C (log ufc/cm<sup>2</sup>) em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.

	Lavagem com Água corrente				Lavagem com Água à pressão				Lavagem com Solução desinfetante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	2,1	2,2	1,8	1,5	1,4	1,6	2,8	3,2	1,5	1,2	3,3	2,5
	2,5	2,1	1,8	1,2	0,8	1,4	2,1	2,9	3,0	<-0,1	3,5	2,6
2ª colheita	2,5	3,5	3,8	3,8	1,1	<-0,1	0,8	2,8	0,9	<-0,1	2,0	2,3
	3,8	2,7	2,7	3,8	1,8	2,2	2,0	3,0	1,8	0,9	1,2	2,4
3ª colheita	1,1	1,8	2,1	3,0	2,7	3,7	1,5	2,6	2,0	0,8	2,1	<-0,1
	2,5	2,1	1,8	3,3	2,0	3,6	2,6	3,1	2,6	0,8	3,1	3,3
4ª colheita	1,1	2,0	1,1	3,1	2,9	2,0	2,7	2,5	1,1	3,0	1,5	<-0,1
	1,1	2,4	4,4	3,4	3,6	1,9	2,5	3,0	0,8	1,4	2,4	2,2

**Nota:** A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem

No que respeita às contagens de bolores e leveduras a 25°C, como se pode observar no Quadro 4.5 e Figura 4.4, os resultados foram significativamente superiores aos observados a 37°C ( $p=6,0 \times 10^{-9}$ , Quadro 4.4 e Figura 4.3), tal como tinha sido verificado para a contagem de germes. Este resultado está em conformidade com o que foi obtido por Abrantes (2008) e também com o que seria esperado, uma vez que a maioria dos microrganismos presentes nos produtos hortofrutícolas e que podem contaminar estas embalagens, são microrganismos psicrófilos e mesófilos (Babesi *et al.*, 2006; Abadias *et al.*, 2008).



**Figura 4.4** - Valores médios e desvio padrão da contagem de bolores e leveduras a 25°C nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização

Os resultados apresentados (Quadro 4.5 e Figura 4.4), indicam que a lavagem com água corrente não se revela um método eficiente na eliminação deste tipo de microrganismos, o que se confirma pelos resultados na análise estatística (ANOVA, 2 entradas). Esta revela que não existem diferenças significativas, na contaminação observada antes e após lavagem ( $p=0,30$ ), assim como não existem diferenças significativas entre materiais em termos da contaminação ( $p=0,19$ ), quer antes da higienização quer após a higienização.

No que respeita à água à pressão, como método de higienização é ineficaz (Quadro 4.5 e Figura 4.4), sendo que, estatisticamente, não existem diferenças significativas, nas contagens antes e após lavagem ( $p=0,21$ ). Este facto verifica-se para os dois tipos de materiais de embalagem testados, plástico e madeira, não tendo sido, igualmente, identificadas, diferenças

significativas entre tipos de embalagens em termos de contaminação com bolores e leveduras a 25°C ( $p=0,13$ ).

Também a utilização do desinfectante na higienização das embalagens foi pouco eficaz. Embora se verifique uma redução na contaminação por bolores e leveduras na superfície das caixas, após a aplicação da higienização, esta redução não é estatisticamente significativa ( $p=0,10$ ). A análise estatística dos resultados permite concluir que a contaminação com bolores e leveduras nas embalagens de madeira é significativamente superior à contaminação observada nas embalagens de plástico ( $p=0,027$ ).

Nas embalagens de plástico, a análise estatística dos resultados permite concluir que a higienização não foi eficaz. Efectivamente, a contaminação com bolores e leveduras, a 25°C, antes e depois da higienização não apresentou uma variação significativa ( $p=0,88$ ). Não se verificaram, também, diferenças significativas entre os três métodos utilizados ( $p=0,077$ ). Na higienização das embalagens de madeira, os resultados foram idênticos. Não se obtiveram diferenças significativas entre métodos de higienização ( $p=0,28$ ), e não se verificou uma redução significativa na contagem de bolores e leveduras após a higienização ( $p=0,36$ ).

Os resultados anteriormente apresentados indicam que os métodos de higienização utilizados são, portanto, pouco eficazes na remoção da contaminação com bolores e leveduras (37°C e 25°C) de caixas de plástico e de madeira.

Para avaliação da limpeza e desinfecção das caixas, não estão definidos critérios relativos à contaminação de superfícies com bolores e leveduras. Para fins de verificação da limpeza e desinfecção de superfícies, a Decisão da Comissão 2001/471/CE estabeleceu apenas categorias de resultados para contagens totais viáveis e *Enterobacteriaceae*. Lehto *et al.* (2010), no seu trabalho, indicam como valor máximo aceitável para leveduras, 0,7 log ufc/cm<sup>2</sup>. Para bolores, os mesmos autores indicam que a contaminação não deve ser “elevada”, sem no entanto definirem valores. Como tal, utilizámos como critério para a avaliação da limpeza e desinfecção de superfícies, em termos da contaminação com bolores, o mesmo valor indicado por Lehto *et al.* para leveduras, ou seja 0,7 log ufc/cm<sup>2</sup>.

Desta forma, e utilizando o valor 0,7 log ufc/cm<sup>2</sup> como critério, quer para bolores quer para leveduras, apresentam-se no Quadro 4.6 a percentagem de resultados considerados aceitáveis, após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e

madeira), em termos da contagem de bolores e de leveduras a 37°C e a 25°C. Na elaboração desta tabela teve-se em conta o facto de que, globalmente, na contagem de bolores e leveduras efectuada nas amostras, cerca de 80% da contaminação correspondeu a bolores e 20% a leveduras. Este predomínio de bolores face a leveduras está em conformidade com o que seria esperado, uma vez que nos produtos hortofrutícolas também se observa um predomínio de bolores face a leveduras (Adams e Moss, 1997).

**Quadro 4.6** - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de bolores e de leveduras a 37°C e a 25°C.

	Lavagem com água corrente		Lavagem com água à pressão		Lavagem com solução desinfetante	
	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira
<b>Contagem de bolores a 37°C</b> (n = 8)	62,5	75	100	75	100	87,5
<b>Contagem de bolores a 25°C</b> (n = 8)	0	0	12,5	0	50	25
<b>Contagem de leveduras a 37°C</b> (n = 8)	100	75	100	100	100	87,5
<b>Contagem de leveduras a 25°C</b> (n = 8)	0	12,5	12,5	0	87,5	25

**Nota:** Resultados aceitáveis,  $\leq 0,7 \log \text{ufc/cm}^2$

A comparação dos resultados apresentados no Quadro 4.6, com os resultados do Quadro 4.3, revela que se obtiveram mais resultados aceitáveis (em %) nas contagens de bolores e de leveduras do que nas contagens de totais viáveis. No entanto, esta diferença resulta principalmente do facto das caixas, antes da higienização, apresentarem uma contaminação em totais viáveis superior à contaminação com bolores e leveduras. Sendo, portanto, a sua remoção a níveis aceitáveis mais dificultada.

Obtiveram-se mais resultados aceitáveis nas contagens de leveduras do que nas contagens de bolores, quer a 37°C quer a 25°C. Também se obtiveram mais resultados aceitáveis nas contagens a 37°C do que nas contagens a 25°C, quer em termos de bolores quer em termos de leveduras. Esta diferença resulta do facto de ser mais fácil higienizar a níveis aceitáveis quando a contaminação inicial é mais reduzida, o que se verificou nas caixas, nas contagens de leveduras (*versus* contagens de bolores) e nas contagens a 37°C (*versus* contagens a 25°C).

Comparando as três metodologias, verifica-se que a metodologia mais eficaz na higienização (pois apresentou uma maior percentagem de resultados aceitáveis) foi a lavagem com solução desinfectante, principalmente nas embalagens de plástico. Tal como previamente observado em termos das contagens de totais viáveis (Quadro 4.3), os resultados apresentados no Quadro 4.6 indicam também que a higienização a níveis aceitáveis das caixas de madeira foi mais difícil do que a higienização das caixas de plástico. Efectivamente, as embalagens de plástico, globalmente, apresentaram uma maior percentagem de resultados aceitáveis do que as embalagens de madeira. Estes resultados confirmam a existência de deficientes métodos de higienização para a madeira, tal como referenciado por Revol-Junelles *et al.* (2005). No entanto, estes resultados mostram também que a higienização a níveis aceitáveis das caixas de plástico é difícil, com os métodos aplicados. Mesmo quando foi utilizada a solução desinfectante, o método mais eficiente, não foi possível obter 100% de resultados aceitáveis nas contagens de bolores e de leveduras a 25°C.

### **4.3 *Bacillus cereus***

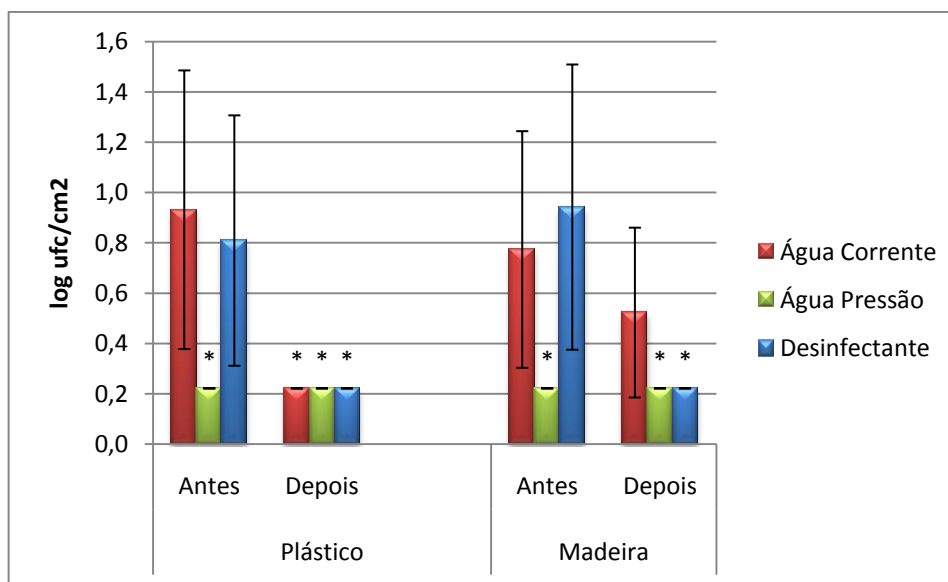
Os resultados obtidos referentes à contagem de *Bacillus cereus*, nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três métodos de higienização ensaiados, são apresentados no Quadro 4.7 e na Figura 4.5.

O *B. cereus*, umabactéria patogénica, pode encontrar-se no solo e portanto, pode contaminar facilmente os produtos hortofrutícolas e as embalagens que os acondicionam (Beuchat, 1998). Através da observação dos resultados apresentados no Quadro 4.7 e na Figura 4.5 pode constatar-se que a contaminação das embalagens, antes da higienização, por *Bacillus cereus*, é reduzida ou não detectável.

**Quadro 4.7** – Contagem de *Bacillus cereus* (log ufc/cm<sup>2</sup>), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfectante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	<0,2	<0,2	0,9	1,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	1,5	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
2ª colheita	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	1,2	<0,2
	1,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	1,5	<0,2	<0,2	<0,2
3ª colheita	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	1,2	<0,2	1,5	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	1,1	<0,2	1,7	<0,2
4ª colheita	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2

**Nota:** A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem



**Figura 4.5** - Valores médios e desvio padrão da contagem de *Bacillus cereus*, nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. **Nota:** as colunas marcadas com asterisco, representam o limite de detecção do método, uma vez que não foram detectadas, em nenhuma amostra, colónias de *B. cereus*.

Em relação à higienização por água à pressão, não é possível tirar conclusões relativas à sua eficiência, pois não foi detectada contaminação com *B. cereus* antes da higienização, em qualquer das amostras. Nas caixas onde foi detectada contaminação, pode verificar-se que as metodologias aplicadas (água corrente ou solução desinfectante) foram eficientes, dado que após o processo não foram detectadas colónias de *B. cereus*. Apenas uma excepção: numa caixa de madeira higienizada com água corrente (Quadro 4.7). Nesta caixa, após a lavagem, ainda foi detectada contaminação com *B. cereus*. A redução na contaminação após o processo de limpeza foi estatisticamente significativa quando foi utilizado o desinfectante ( $p=0,043$ ) e não foi significativa quando foi utilizada água corrente ( $p=0,13$ ).

Não se observaram diferenças significativas entre materiais (plástico e madeira), em termos de contaminação com *B. cereus* ( $p_{\text{água corrente}}=0,66$ ;  $p_{\text{desinfetante}}=0,91$ ). Estatisticamente, não se observaram, também, diferenças significativas entre métodos de higienização, quer nas embalagens de plástico quer nas embalagens de madeira ( $p_{\text{plástico}}=0,18$ ;  $p_{\text{madeira}}=0,36$ ). Nas embalagens de plástico, a redução na contaminação após o processo de limpeza foi estatisticamente significativa ( $p=0,016$ ). Como já referido, em todas as embalagens, após higienização, não foi detectada esta bactéria. Nas embalagens de madeira, a redução da contaminação não foi estatisticamente significativa ( $p=0,25$ ).

Para avaliação da limpeza e desinfecção das caixas, não estão definidos critérios relativos à contaminação de superfícies com *B. cereus*. No entanto, Legnani *et al.* (2004), referem que após a higienização de superfícies, os resultados só devem ser considerados aceitáveis quando não são detectados patogénicos. Desta forma, apresentam-se no Quadro 4.8 a percentagem de resultados considerados aceitáveis, após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de *B. cereus*.

**Quadro 4.8** - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de *B. cereus*.

	Lavagem com água corrente		Lavagem com água à pressão		Lavagem com solução desinfetante	
	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira
<b>Contagem de <i>B. cereus</i></b> ( $n = 8$ )	100	87,5	100*	100*	100	100

**Nota:** Resultados aceitáveis: ausência ; \* Não foi detectada contaminação antes da higienização.



A análise do Quadro 4.8 indica que a lavagem com solução desinfectante é eficaz na remoção de *B. cereus*, quer nas embalagens de plástico quer nas embalagens de madeira, pois obtiveram-se 100% de resultados aceitáveis. A lavagem com água corrente também foi eficaz na higienização das embalagens de plástico. Nas embalagens de madeira, como apenas se obtiveram 87,5% de resultados aceitáveis, a metodologia foi considerada menos eficaz. Embora o Quadro 4.8 apresente 100% de resultados aceitáveis na utilização de água à pressão, na prática, tal como referido anteriormente, não é possível tirar conclusões relativas à sua eficiência, pois não foi detectada contaminação com *B. cereus* antes da higienização.

#### **4.4 *Pseudomonas aeruginosa***

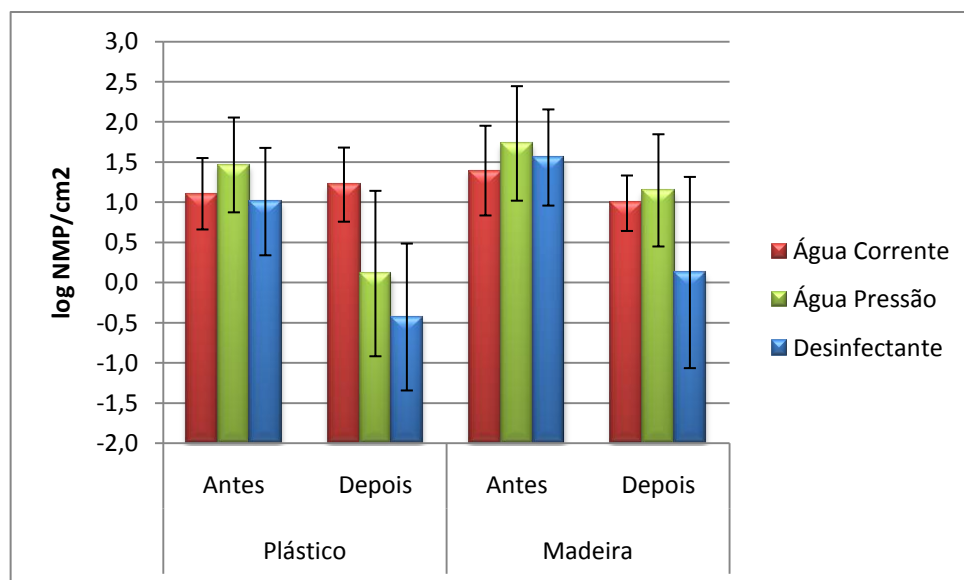
Os resultados obtidos referentes à contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (ensaio presumptivo), nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três métodos de higienização ensaiados, são apresentados no Quadro 4.9 e na Figura 4.6. Esta bactéria gram-negativa, responsável por um grande número de infecções no Homem, aparece associada à microflora da fruta e hortaliças, mas a sua ocorrência é comum em outros ambientes como o solo ou a água (Adams e Moss, 1997; Mendes e Oliveira, 2004). Tal como se pode observar no Quadro 4.9 e na Figura 4.6, é um microrganismo bastante recorrente nas embalagens analisadas, que apresentaram uma contaminação superior à relativa a *B. cereus*.

As higienizações efectuadas tiveram efeitos distintos na redução das contagens deste microrganismo. Na lavagem com água corrente não se registaram alterações significativas de contagem, antes e após higienização ( $p=0,50$ ) tendo em conta os dois tipos de embalagem analisados, sendo que também não existiram diferenças significativas entre resultados, para os dois materiais ( $p=0,66$ ). Este método não foi, portanto, eficaz, na remoção do microrganismo em estudo.

**Quadro 4.9** - Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (ensaio presumptivo) (log NMP/cm<sup>2</sup>), nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfetante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	1,6	0,6	1,6	0,6	1,8	0,0	2,6	1,1	0,1	-0,2	1,1	<-2,0
	1,6	0,6	1,6	0,6	1,4	0,2	1,4	1,4	0,5	-0,2	1,1	<-2,0
2ª colheita	0,8	1,6	1,6	1,2	0,1	0,5	1,1	0,1	1,1	-0,2	0,5	<-2,0
	0,8	1,2	1,6	0,8	0,8	0,5	1,1	0,2	1,6	<-2,0	0,8	-0,2
3ª colheita	0,5	0,5	0,1	0,8	0,8	<-2,0	1,1	0,1	1,2	<-2,0	0,5	0,1
	0,8	0,8	0,5	1,5	1,6	<-2,0	0,5	0,1	1,0	-0,5	2,2	0,4
4ª colheita	0,6	1,5	1,3	0,8	1,4	0,0	0,8	1,8	-0,3	-0,1	1,1	0,5
	0,4	1,5	1,5	0,5	1,8	-0,2	0,1	0,1	0,0	<-2,0	1,8	0,5

Nota: A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem



**Figura 4.6** - Valores médios e desvio padrão da contagem de *Pseudomonas aeruginosa* (ensaio presumptivo), nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização.

Na higienização com água a pressão não se observaram diferenças significativas entre materiais em termos de contaminação com este microrganismo ( $p=0,13$ ), mas é efectivamente um método capaz de diminuir a contaminação por *Pseudomonas*, o que é comprovado estatisticamente, uma vez que as diferenças existentes antes e após lavagem são significativas ( $p=0,00077$ ). No entanto, esta redução tem expressão significativa apenas nas embalagens de plástico ( $p=0,0019$ ) e não nas embalagens de madeira ( $p=0,20$ ).

A acção do desinfectante demonstrou ser eficiente na diminuição da contaminação com *Pseudomonas*, quer no plástico quer na madeira, uma vez que a redução das contagens após higienização é estatisticamente significativa ( $p=1,1 \times 10^{-5}$ ), não se verificando diferenças entre materiais em termos de contaminação com *Pseudomonas* ( $p=0,19$ ).

No que respeita às embalagens de plástico, a higienização conduziu à redução significativa da contaminação ( $p=1,9 \times 10^{-5}$ ), mas os três métodos de higienização utilizados apresentam diferenças significativas entre si ( $p=0,00052$ ), sendo que a água corrente não remove a contaminação, ao contrário da utilização da água à pressão e do desinfectante, que removem significativamente a contaminação.

Em relação às embalagens de madeira, a higienização conduziu à redução significativa da contaminação ( $p=1,9 \times 10^{-4}$ ), embora as metodologias de higienização testadas tenham apresentado diferenças significativas entre si ( $p=0,018$ ), sendo que a acção do desinfectante se revelou o método mais eficaz na limpeza destas embalagens, ao reduzir significativamente a contaminação com pseudomonas.

Para avaliação da limpeza e desinfecção das caixas, não estão definidos critérios relativos à contaminação de superfícies com *P. aeruginosa*. Utilizámos também para este patógeno o mesmo critério que aplicámos na contaminação com *B. cereus*, ou seja, após a higienização de superfícies, os resultados só devem ser considerados aceitáveis quando não são detectados patógenos (Legnani *et al.*, 2004). Desta forma, apresentam-se no Quadro 4.10 a percentagem de resultados considerados aceitáveis, após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de *P. aeruginosa*.

**Quadro 4.10** - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de *P. aeruginosa* (ensaio presumptivo)

	Lavagem com água corrente		Lavagem com água à pressão		Lavagem com solução desinfetante	
	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira
<b>Contagem de <i>P. aeruginosa</i></b> ( <i>n</i> = 8)	0	0	25	0	37,5	37,5

**Nota:** Resultados aceitáveis: ausência

Na análise do Quadro 4.10 deve referir-se que a percentagem de resultados aceitáveis obtidos poderia aumentar, se os valores das contagens diminuíssem após confirmação dos resultados presumptivos apresentados no Quadro 4.9 e Figura 4.6. No entanto, estes resultados presumptivos, apesar de não confirmados, indicam uma tendência clara. Embora nenhuma das metodologias tenha apresentado 100% de resultados aceitáveis, a solução desinfetante é a metodologia mais eficaz na remoção de *P. aeruginosa*, quer nas embalagens de madeira quer nas embalagens de plástico. Quando foi utilizada a água à pressão, a higienização das caixas de plástico apresentou um número superior de resultados aceitáveis, significando que este método é mais eficaz neste tipo de material do que nas embalagens de madeira. Mas na lavagem com água corrente e com a solução desinfetante, os resultados obtidos foram iguais em ambos tipos de materiais, ou seja, a eficiência do método foi semelhante no plástico e na madeira. Em termos de remoção de *P. aeruginosa*, verifica-se que se obteve um número significativamente mais reduzido de resultados aceitáveis do que na remoção de *B. cereus*. A remoção a níveis aceitáveis, de *P. aeruginosa* das caixas, foi mais difícil, talvez porque as caixas apresentavam uma contaminação inicial neste microrganismo superior à contaminação com *B. cereus*.

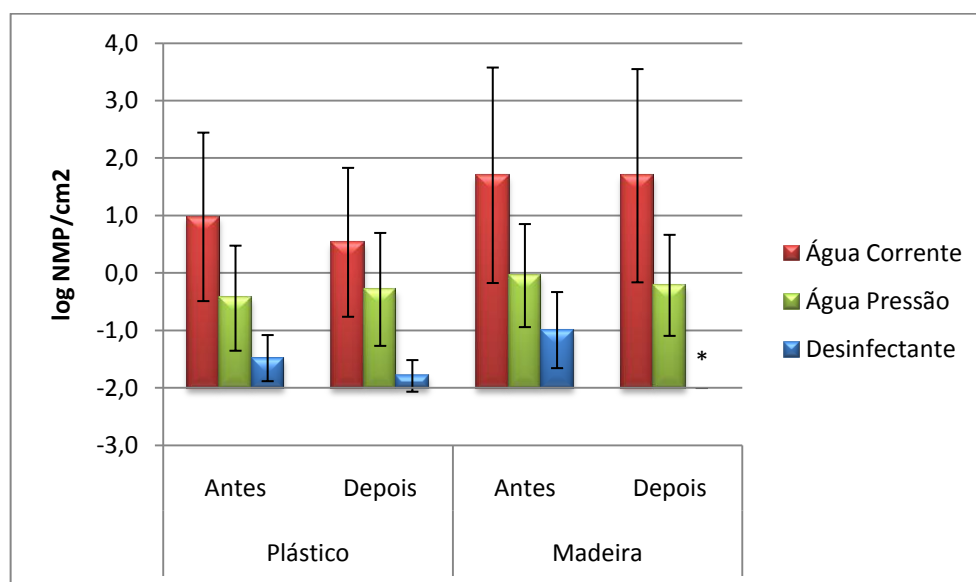
#### 4.5 Bactérias coliformes e *Escherichia coli*

Os resultados obtidos referentes à contagem de bactérias coliformes, nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três métodos de higienização ensaiados, são apresentados no Quadro 4.11 e na Figura 4.7.

**Quadro 4.11** - Contagem de bactérias coliformes (log NMP/cm<sup>2</sup>), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfectante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1 <sup>a</sup> colheita	-0,3	-0,5	<-2,0	<-2,0	-0,3	<-2,0	-1,2	-1,0	-1,2	<-2,0	-1,2	<-2,0
	1,6	0,6	0,6	<-2,0	-0,2	<-2,0	0,4	-0,2	-1,2	<-2,0	-1,2	<-2,0
2 <sup>a</sup> colheita	0,6	0,8	1,6	1,6	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-1,3	-1,2	-0,2	<-2,0
	1,6	1,2	0,6	-0,5	<-2,0	<-2,0	-1,2	-1,3	-1,2	<-2,0	<-2,0	<-2,0
3 <sup>a</sup> colheita	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-0,3	0,6	-0,2	-0,6	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-1,3	-1,2	0,6	0,6	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
4 <sup>a</sup> colheita	-1,2	-1,3	<-2,0	<-2,0	0,1	-0,3	-0,2	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	-1,2	-1,3	2,6	2,6	<-2,0	<-2,0	-1,2	-0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0

**Nota:** A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem



**Figura 4.7** - Valores médios e desvio padrão da contagem de bactérias coliformes, nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. **Nota:** as colunas marcadas com asterisco, representam o limite de detecção do método, uma vez que não foram detectadas, em nenhuma amostra, bactérias coliformes.

As bactérias coliformes são consideradas bons indicadores de contaminação fecal (Mendes e Oliveira, 2004), como tal, a sua presença nas embalagens de hortofrutícolas é devida ao contacto com fezes de animais, solo, águas residuais ou de rega, entre outras (Adams e Moss, 1997). No entanto, tal como se pode observar no Quadro 4.11 e na Figura 4.7, é um grupo de microrganismos que apresentou pouca expressão nas embalagens analisadas, por comparação, por exemplo, com a contaminação devida a *pseudomonas*.

Por observação do Quadro 4.11 e Figura 4.7 pode constatar-se que a lavagem com água corrente e com água à pressão, quer para o plástico quer para a madeira, não reduziu significativamente a contaminação por bactérias coliformes ( $p_{\text{água corrente}}=0,56$ ;  $p_{\text{água à pressão}}=0,36$ ). A higienização com a solução desinfectante foi mais eficaz, tendo-se verificado uma redução significativa da contaminação por bactérias coliformes ( $p=0,022$ ). Em qualquer das metodologias de higienização testadas, não se verificaram diferenças significativas entre o plástico e a madeira em termos de contaminação por bactérias coliformes ( $p_{\text{água corrente}}=0,87$ ;  $p_{\text{água à pressão}}=0,20$ ;  $p_{\text{desinfetante}}=0,83$ ).

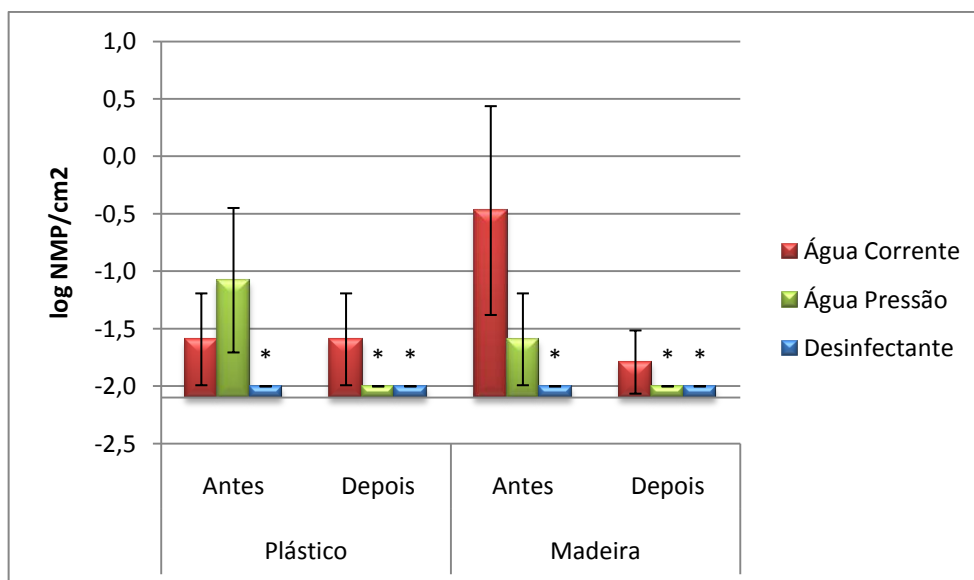
Em relação à higienização do plástico, globalmente não se verificou uma redução significativa da contaminação por bactérias coliformes ( $p=0,33$ ). No entanto, os resultados apontam para a existência de diferenças significativas entre os métodos empregues ( $p=0,0028$ ), sendo que a aplicação da solução desinfectante foi a metodologia mais eficaz, tendo reduzido significativamente a contaminação. Nas embalagens de madeira, os resultados são semelhantes. Globalmente, não se verificou uma redução significativa da contaminação devido à higienização ( $p=0,29$ ), mas entre as metodologias há diferenças significativas ( $p=0,016$ ), sendo que, mais uma vez, a acção do desinfetante se revelou o método mais eficaz, tendo reduzido significativamente a contaminação. Nas embalagens de madeira, após lavagem com a solução desinfectante, não foram detectadas bactérias coliformes, o que significa uma correcta higienização face a estes microrganismos.

Os resultados obtidos referentes à contagem de *E. coli*, nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três métodos de higienização ensaiados, são apresentados no Quadro 4.12 e na Figura 4.8.

**Quadro 4.12** - Contagem de *Escherichia coli* (log NMP/cm<sup>2</sup>), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfectante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	-0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
2ª colheita	-0,9	-0,9	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	-1,2	-1,2	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
3ª colheita	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-0,9	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
4ª colheita	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-0,2	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	0,4	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0

**Nota:** A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem



**Figura 4.8** - Valores médios e desvio padrão da contagem de *E. coli*, nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. **Nota:** as colunas marcadas com asterisco, representam o limite de detecção do método, uma vez que não foi detectada, em nenhuma amostra, *E. coli*.

A *E. coli* é um organismo de origem reconhecidamente fecal, sendo considerada como um indicador específico deste tipo de contaminação (Mendes e Oliveira, 2004). Podendo estar presente nas fezes e águas residuais domésticas (Mendes e Oliveira, 2004), a sua presença nas embalagens de hortofrutícolas é devida ao contacto com este tipo de poluentes. Nas embalagens estudadas, a sua presença teve pouca expressão, tal como se pode observar no Quadro 4.12 e na Figura 4.8, não tendo sido detectada na maioria das embalagens.

Sendo a presença de *Escherichia coli* nas amostras analisadas muito reduzida ou não detectável, para se poder concluir acerca da eficiência dos métodos utilizados seria necessário um maior número de ensaios e de caixas significativamente contaminadas com *E. coli* (antes da higienização). No entanto, pelo que se pode observar no Quadro 4.12 o aparecimento de *E. coli* ocorreu quer na madeira, quer no plástico (sem variações significativas), sendo que os processos de higienização empregues, de uma forma geral, conduziram à diminuição, ou eliminação, das contagens deste microrganismo (mas sem significado estatístico). Entre métodos de higienização também não foi observada uma variação significativa, sendo que em relação à higienização com a solução desinfetante, não é possível tirar conclusões relativas à sua eficiência, pois não foi detectada contaminação com *E. coli* antes da higienização, em nenhuma das amostras. No ensaio da lavagem com água à pressão, nas caixas onde foi detectada contaminação inicial (apenas numa de plástico e numa de madeira), pode verificar-se que a higienização aplicada (água à pressão) foi eficiente, dado que após o processo não foi detectada *E. coli*. Na lavagem com água corrente, o processo não foi tão eficiente, pois após higienização ainda foi detectada contaminação com *E. coli* em duas caixas (uma de plástico e uma de madeira).

Para avaliação da limpeza e desinfecção das caixas, não estão definidos critérios relativos à contaminação de superfícies com bactérias coliformes. A Decisão da Comissão 2001/471/CE estabeleceu apenas categorias de resultados para *Enterobacteriaceae*. Como tal, utilizámos como critério para a avaliação da limpeza e desinfecção de superfícies, em termos da contaminação com bactérias coliformes, o valor máximo aceitável indicado para *Enterobacteriaceae*, ou seja 1 ufc/cm<sup>2</sup> (0 log ufc/cm<sup>2</sup>). Este valor é semelhante ao valor apresentado por Lehto *et al.* (2010), que indicam como máximo aceitável para *Enterobacteriaceae* 1,1 ufc/cm<sup>2</sup> (0,04 log ufc/cm<sup>2</sup>). A Decisão da Comissão 2001/471/CE não tem também critérios estabelecidos para *E. coli*, mas Legnani *et al.* (2004), atribuem como valor máximo aceitável para a contaminação de superfícies com *E. coli*, o mesmo valor



indicado para *Enterobacteriaceae* pela Decisão da Comissão 2001/471/CE, ou seja 1 ufc/cm<sup>2</sup> (0 log ufc/cm<sup>2</sup>). Desta forma, e utilizando este valor como critério, quer para bactérias coliformes quer para *E. coli*, apresentam-se no Quadro 4.13 a percentagem de resultados considerados aceitáveis, após cada um dos métodos de higienização estudados e para cada tipo de material (plástico e madeira).

**Quadro 4.13** - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de bactérias coliformes e de *E. coli*.

	Lavagem com água corrente		Lavagem com água à pressão		Lavagem com solução desinfectante	
	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira
<b>Contagem de bactérias coliformes</b> (n = 8)	62,5	75	87,5	87,5	100*	100*
<b>Contagem de <i>E. coli</i></b> (n = 8)	100*	100*	100*	100*	100*	100*

**Nota:** Resultados aceitáveis,  $\leq 0 \log \text{ufc/cm}^2$

\* Contaminação abaixo do limite aceitável mesmo antes da higienização.

Os resultados apresentados indicam que a lavagem com água corrente e com água à pressão são pouco eficientes na eliminação das bactérias coliformes, pois com recurso a estas metodologias não foi possível obter 100% de resultados aceitáveis, quer no plástico quer na madeira. A solução desinfectante apresenta 100% de resultados aceitáveis, quer na madeira quer no plástico. No entanto, é de referir, que nestas amostras, antes da higienização, a contaminação existente nas caixas, embora significativamente superior, também já cumpria este critério. Portanto, para avaliar correctamente a eficácia da solução desinfectante na remoção de bactérias coliformes deste tipo de embalagens, seria necessário efectuar mais ensaios com caixas significativamente mais contaminadas (ou seja, com níveis de contaminação iniciais superiores a 1 ufc/cm<sup>2</sup>).

Em relação à contaminação com *E. coli*, todas as metodologias, quer no plástico, quer na madeira, apresentaram 100% de resultados aceitáveis. No entanto, antes da higienização, em todas as amostras (com excepção de uma), os resultados também já cumpriam o critério e eram aceitáveis. Portanto, e como já referido, para se poder concluir acerca da eficiência dos métodos utilizados na remoção de *E. coli*, seria necessário um maior número de ensaios em caixas significativamente mais contaminadas com este microrganismo (ou seja, com níveis de contaminação iniciais superiores a 1 ufc/cm<sup>2</sup>).

## 4.6 Enterococos

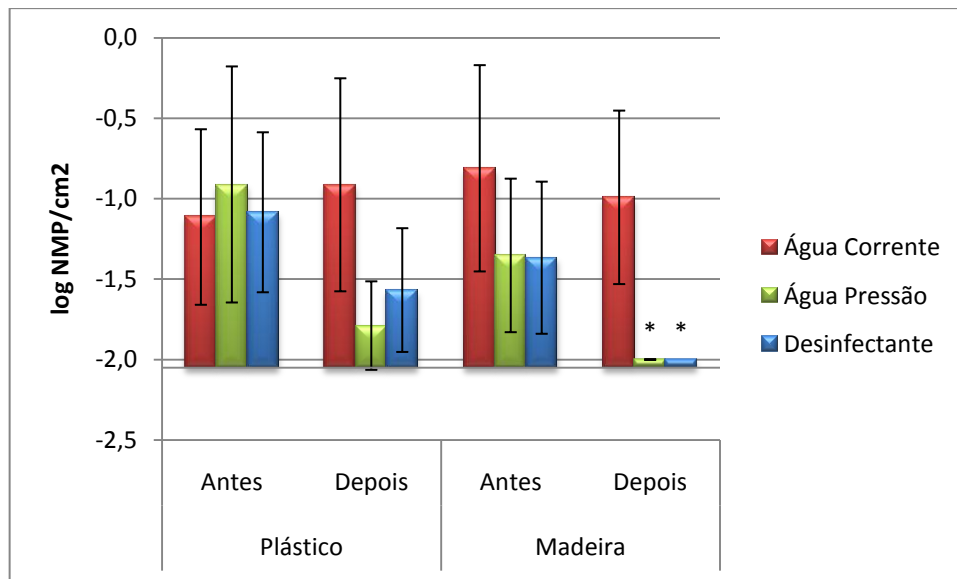
Os resultados obtidos referentes à contagem de enterococos, nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três métodos de higienização ensaiados, são apresentados no Quadro 4.14 e na Figura 4.9.

**Quadro 4.14** - Contagem de enterococos (log NMP/cm<sup>2</sup>), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfetante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	-0,5	-0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-1,2	<-2,0	-1,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	-0,5	-0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-1,2	<-2,0
2ª colheita	<-2,0	<-2,0	-0,5	-0,9	-0,6	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-0,5	-1,2	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	-1,2	-1,2	-1,2	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-1,2	-1,2	<-2,0	<-2,0
3ª colheita	-1,2	-1,2	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-1,2	<-2,0	-1,3	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	-1,2	-0,9	-0,5	-0,9	<-2,0	<-2,0	-1,2	<-2,0	-1,1	<-2,0	-1,0	<-2,0
4ª colheita	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-0,2	-1,2	-1,2	<-2,0	-1,3	-1,3	<-2,0	<-2,0
	-1,2	-0,5	-1,2	-1,2	<-2,0	<-2,0	-0,9	<-2,0	<-2,0	<-2,0	-1,5	<-2,0

**Nota:** A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem

A presença de enterococos nas amostras significa uma indicação de poluição fecal (Mendes e Oliveira, 2004). No entanto, como se pode observar pela análise do Quadro 4.14 e Figura 4.9, nas embalagens estudadas, a sua presença é muito reduzida ou não detectável, representando uma contaminação significativamente inferior à relativa a bactérias coliformes.



**Figura 4.9** - Valores médios e desvio padrão da contagem de enterococos nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. **Nota:** as colunas marcadas com asterisco, representam o limite de detecção do método, uma vez que não foi detectada, em nenhuma amostra, enterococos.

Por observação do Quadro 4.14 e Figura 4.9 pode constatar-se que a lavagem com água corrente, quer para o plástico quer para a madeira, não reduziu significativamente a contaminação por enterococos ( $p=0,61$ ). A lavagem com água à pressão e a higienização com a solução desinfetante, foram mais eficazes, pois a redução da contaminação foi significativa ( $p_{\text{água à pressão}}=0,016$ ;  $p_{\text{desinfetante}}=0,0069$ ). No entanto, esta redução tem expressão significativa apenas nas embalagens de madeira e não nas embalagens de plástico. Com efeito, nas embalagens de plástico, não se observaram diferenças significativas entre métodos de higienização ( $p=0,19$ ) e a redução da contaminação não foi significativa ( $p=0,17$ ). Nas embalagens de madeira, globalmente não se verificou uma redução significativa da contaminação por enterococos ( $p=0,071$ ). No entanto, os resultados apontam para a existência de diferenças significativas entre os métodos empregues ( $p=0,0039$ ), sendo que a água corrente não reduz a contaminação, ao contrário da utilização da água à pressão e do desinfetante, que removem significativamente a contaminação (não foram detectados enterococos após higienização). Em qualquer das metodologias de higienização testadas, não se verificaram diferenças significativas entre o plástico e a madeira em termos de contaminação por enterococos ( $p_{\text{água corrente}}=0,76$ ;  $p_{\text{água à pressão}}=0,62$ ;  $p_{\text{desinfetante}}=0,062$ ).

Para avaliação da limpeza e desinfecção das caixas, não estão definidos critérios relativos à contaminação de superfícies com enterococos. Neste caso, optámos por utilizar como critério, o valor que foi utilizado para as contagens de bactérias coliformes, ou seja 1 ufc/cm<sup>2</sup> (0 log ufc/cm<sup>2</sup>). Desta forma, apresentam-se no Quadro 4.15 a percentagem de resultados considerados aceitáveis, após cada um dos métodos de higienização estudados e para cada tipo de material (plástico e madeira).

**Quadro 4.15** - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de enterococos.

	Lavagem com água corrente		Lavagem com água à pressão		Lavagem com solução desinfectante	
	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira
<b>Contagem de enterococos</b> (n = 8)	100*	100*	100*	100*	100*	100*

**Nota:** Resultados aceitáveis,  $\leq 0$  log ufc/cm<sup>2</sup>

\* Contaminação abaixo do limite aceitável mesmo antes da higienização.

Em relação à contaminação com enterococos, todas as metodologias, quer no plástico, quer na madeira, apresentaram 100% de resultados aceitáveis. No entanto, antes da higienização, em todas as amostras, os resultados também já cumpriam o critério e eram aceitáveis. Portanto, para avaliar correctamente a eficácia das metodologias na remoção de enterococos deste tipo de embalagens, seria necessário efectuar mais ensaios com caixas significativamente mais contaminadas (ou seja, com níveis de contaminação iniciais superiores a 1 ufc/cm<sup>2</sup>).

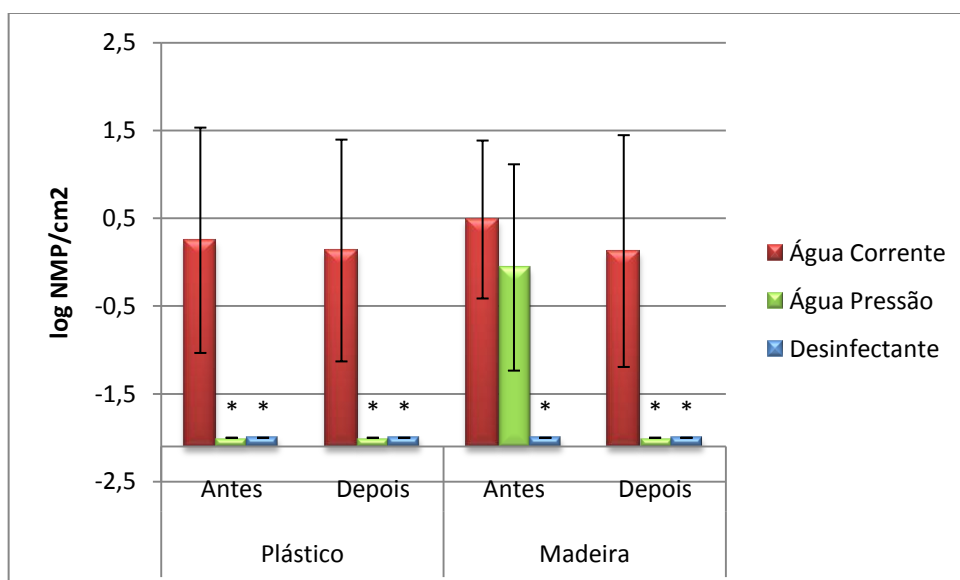
#### 4.7 *Clostridium perfringens*

Os resultados obtidos referentes à contagem de *C. perfringens* (ensaio presumptivo), nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três métodos de higienização ensaiados, são apresentados no Quadro 4.16 e na Figura 4.10.

**Quadro 4.16** - Contagem de *Clostridium perfringens* (ensaio presumptivo)(log NMP/cm<sup>2</sup>), em embalagens de plástico e de madeira, antes e após três tipos distintos de higienização.

	Lavagem com água corrente				Lavagem com água à pressão				Lavagem com solução desinfetante			
	Plástico		Madeira		Plástico		Madeira		Plástico		Madeira	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
1ª colheita	0,6	0,6	0,6	0,6	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	0,6	0,6	0,6	0,6	<-2,0	<-2,0	0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
2ª colheita	0,5	0,5	0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	0,5	<-2,0	0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
3ª colheita	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
4ª colheita	-1,2	-0,8	0,5	0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0
	<-2,0	<-2,0	0,5	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0	<-2,0

Nota: A – Antes da Lavagem; D – Depois da Lavagem



**Figura 4.10** - Valores médios e desvio padrão da contagem de *Clostridium perfringens* (ensaio presumptivo), nas amostras recolhidas nas embalagens de plástico e de madeira, antes e após os três tipos de higienização. Nota: as colunas marcadas com asterisco, representam o limite de detecção do método, uma vez que não foi detectada, em nenhuma amostra, *C. perfringens*.

A presença de *C. perfringens* nas amostras significa uma indicação de poluição fecal (Mendes e Oliveira, 2004). Como se pode observar pela análise do Quadro 4.16 e Figura 4.10, nas embalagens estudadas, a sua presença teve pouca expressão, representando uma contaminação muito reduzida ou mesmo não detectável, semelhante à dos enterococos.

Por observação do Quadro 4.16 e Figura 4.10 pode constatar-se que a lavagem com água corrente, quer para o plástico quer para a madeira, não reduziu significativamente a contaminação com *C. perfringens* ( $p=0,083$ ). Nestas amostras não se verificaram diferenças significativas entre o plástico e a madeira em termos de contaminação com *C. perfringens* ( $p=0,42$ ). Em relação à higienização por água à pressão, não é possível tirar conclusões relativas à sua eficiência nas embalagens de plástico, pois não foi detectada contaminação com *C. perfringens* em qualquer das amostras analisadas, antes e depois da higienização. No caso das embalagens de madeira, a utilização de água à pressão remove a contaminação eficazmente. Efectivamente, nas duas caixas que apresentaram contaminação inicial, após o processo, não foi detectada contaminação com *C. perfringens*. No entanto, esta redução não tem significado estatístico ( $p=0,15$ ). Em relação à higienização com a solução desinfectante, não é possível tirar conclusões relativas à sua eficiência, pois não foi detectada contaminação com *C. perfringens* em qualquer das amostras analisadas, antes e depois da higienização, quer nas embalagens de madeira quer nas embalagens de plástico. Portanto, para se poder concluir acerca da eficiência deste método seria necessário um maior número de ensaios e de caixas contaminadas com *C. perfringens*. No caso deste indicador, o estudo da avaliação da solução desinfectante como método de higienização suscita ainda mais interesse porque os esporos de *C. perfringens* são resistentes à acção do cloro (Mendes e Oliveira, 2004). Nas embalagens de madeira, a análise global dos resultados aponta para uma redução significativa da contaminação ( $p=0,011$ ) pela higienização, verificando-se que a utilização de água à pressão é significativamente mais eficiente do que a limpeza com água corrente ( $p=0,0011$ ).

Para avaliação da limpeza e desinfecção das caixas, não estão definidos critérios relativos à contaminação de superfícies com *C. perfringens*. Utilizámos também para este patógeno o mesmo critério que aplicámos anteriormente para os outros patógenos analisados, ou seja, após a higienização de superfícies, os resultados só devem ser considerados aceitáveis quando não são detectados patógenos (Legnani *et al.*, 2004). Desta forma, apresentam-se no Quadro 4.17 a percentagem de resultados considerados aceitáveis, após cada um dos métodos de

higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de *C. perfringens*.

**Quadro 4.17** - Resultados considerados aceitáveis (%), após cada um dos métodos de higienização estudados, para cada tipo de material (plástico e madeira), em termos da contagem de *C. perfringens* (ensaio presumptivo)

	Lavagem com água corrente		Lavagem com água à pressão		Lavagem com solução desinfetante	
	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira	Plástico	Madeira
<b>Contagem de <i>C. perfringens</i> (n = 8)</b>	50	62,5	100*	100	100*	100*

**Nota:** Resultados aceitáveis: ausência

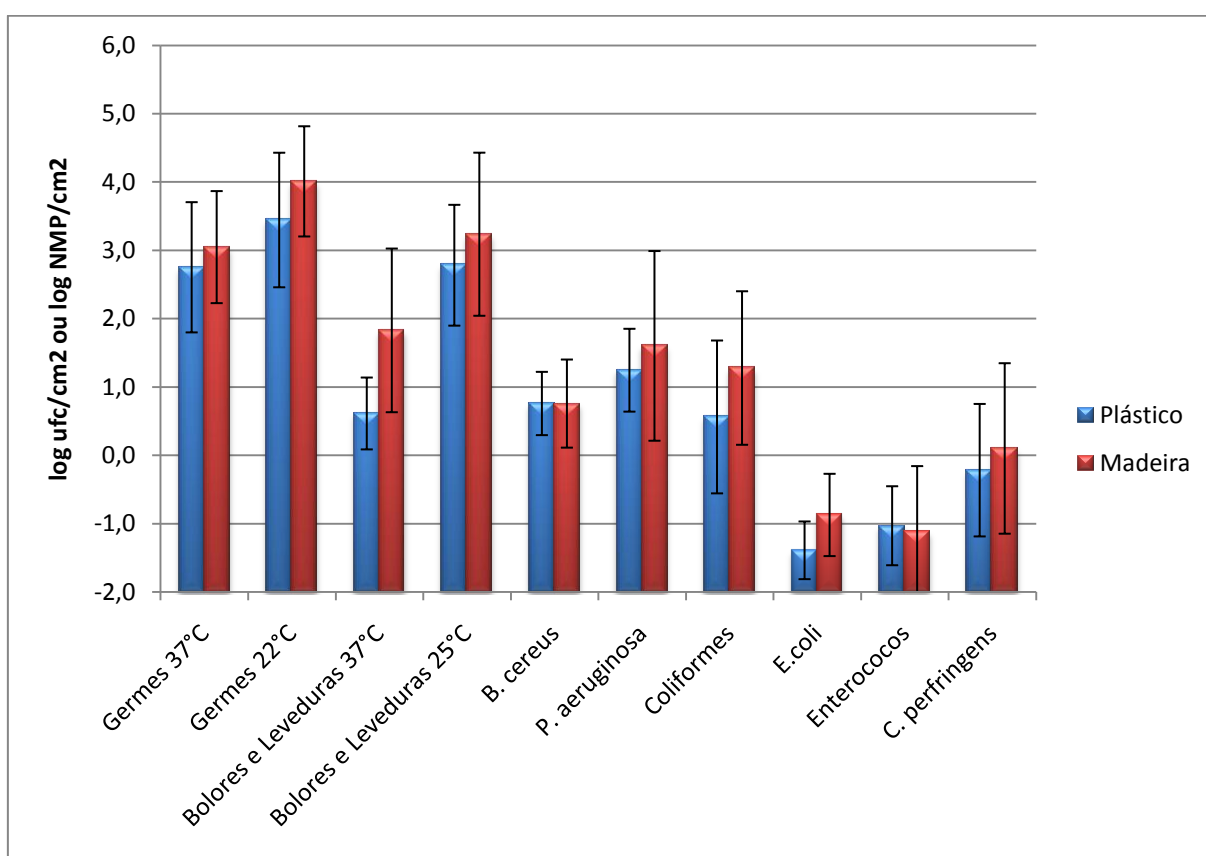
\* Não foi detectada contaminação antes da higienização.

Na análise do Quadro 4.17 deve referir-se que a percentagem de resultados aceitáveis obtidos poderia aumentar (no caso da lavagem com água corrente), se os valores das contagens diminuíssem após confirmação dos resultados presumptivos apresentados no Quadro 4.16 e Figura 4.10.

Os resultados apresentados indicam que a lavagem com água corrente é pouco eficiente na eliminação de *C. perfringens*, pois com recurso a esta metodologia não foi possível obter 100% de resultados aceitáveis, quer no plástico quer na madeira. A lavagem com água à pressão, nas embalagens de madeira, apresenta 100% de resultados aceitáveis, e portanto revelou eficácia (embora só duas em oito caixas tivessem apresentado contaminação inicial). No caso da lavagem com solução desinfetante, quer no plástico quer na madeira, e na lavagem com água à pressão, nas embalagens de plástico, embora sejam apresentados 100% de resultados aceitáveis, não é possível tirar conclusões relativas à sua eficiência, pois não foi detectada contaminação com *C. perfringens* antes da higienização. Portanto, para se poder concluir acerca da eficiência da água à pressão e da solução desinfetante na remoção de *C. perfringens*, seria necessário um maior número de ensaios em caixas contaminadas com este microrganismo.

#### 4.8 Análise global

Através dos resultados apresentados anteriormente é possível constatar que as embalagens analisadas possuem índices de contaminação inicial variados, não só em termos de tipo de microrganismo, mas também de quantidade, sendo que existem, efectivamente, microrganismos que surgem em maior abundância, comparativamente a outros. A Figura 4.11 mostra um gráfico comparativo dos resultados obtidos referentes aos diversos microrganismos pesquisados e enumerados nas embalagens de hortofrutícolas analisadas, antes dos processos de higienização.



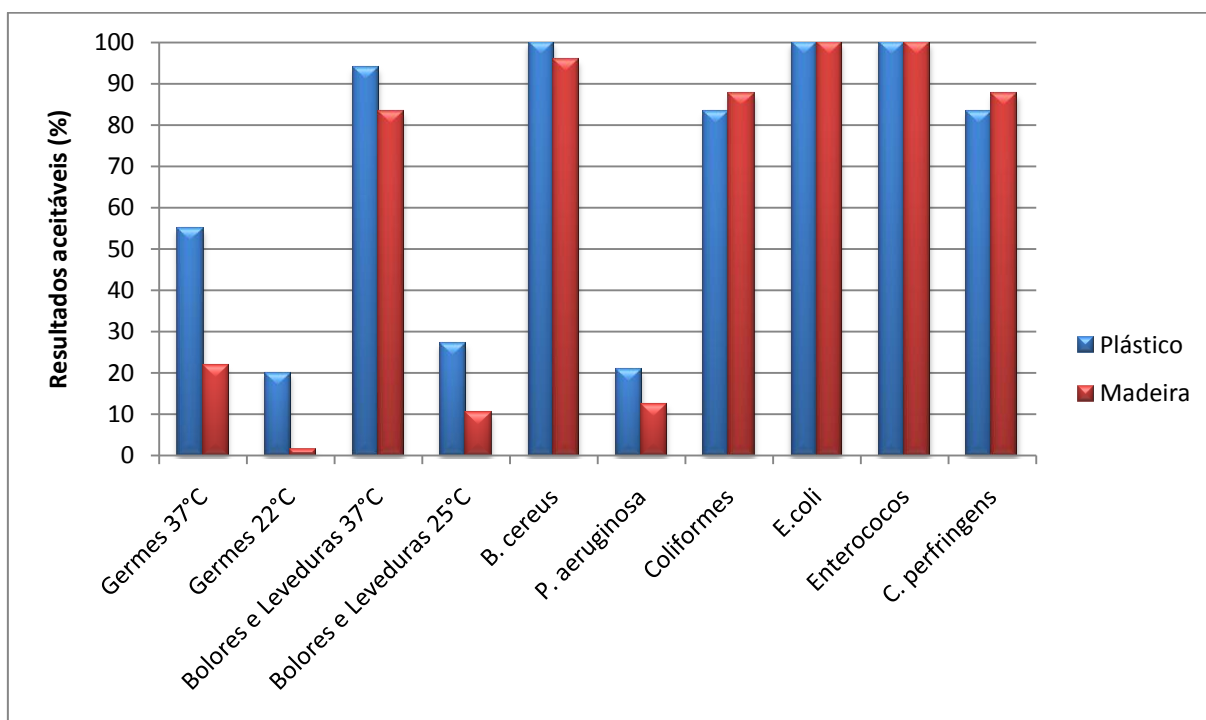
**Figura 4.11** – Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos antes da lavagem nas superfícies das embalagens de hortofrutícolas analisadas.

Por observação da Figura 4.11 pode constatar-se que as contagens de microrganismos totais viáveis a 37°C e a 22°C apresentaram os valores mais elevados, logicamente uma vez que esta análise reflecte a contaminação global. Em relação aos microrganismos pesquisados e enumerados a maior contaminação deve-se a bolores e leveduras, seguindo-se o grupo da *P. aeruginosa*, dos coliformes e do *B. cereus*. Por ordem de grandeza decrescente, segue-se a contaminação com *C. perfringens* e com enterococos. A menor contaminação observada foi devida a *E. coli*. Esta ordem comparativa de grandeza é semelhante à que foi observada no



trabalho de Abrantes (2008). Embora as embalagens de madeira apresentem uma contaminação mais elevada que as embalagens de plástico, esta diferença não é significativa, o que vem também reforçar os resultados apresentados por Abrantes (2008).

A Figura 4.12 apresenta, para cada parâmetro pesquisado e enumerado, a % de resultados aceitáveis, após higienização das embalagens, por tipo de material (plástico e madeira).

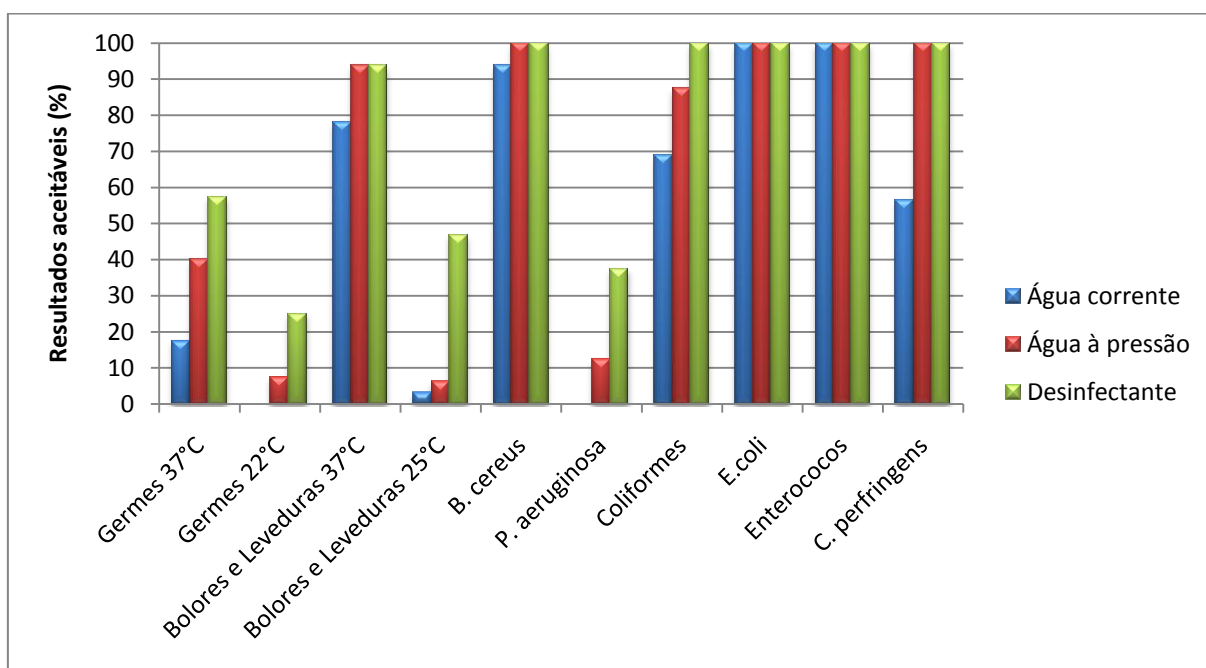


**Figura 4.12** – Valores médios dos resultados aceitáveis (%) obtidos após higienização das embalagens de hortofrutícolas analisadas por tipo de material (plástico e madeira).

Pode verificar-se que, de um modo geral, quanto maior a contaminação inicial (Figura 4.11), maior é a dificuldade em remover a níveis aceitáveis a contaminação, obtendo-se menos resultados aceitáveis (em %) após higienização. A higienização das embalagens foi menos eficaz na remoção de totais viáveis (a 37°C e a 22°C), de bolores e leveduras a 25°C e particularmente de *P. aeruginosa*. Em relação aos restantes parâmetros, os valores médios são relativamente elevados, aproximando-se de 100%. No entanto, é de referir que para alguns dos indicadores estudados, a contaminação inicial era também muito reduzida. Para avaliar efectivamente a eficiência da higienização na remoção de alguns destes indicadores das caixas de hortofrutícolas serão necessários mais ensaios e com caixas contaminadas com valores significativamente mais elevados. É possível também verificar que as embalagens de madeira são de higienização mais difícil do que o plástico, sobretudo em termos da remoção de totais viáveis (a 37°C e a 22°C) e de bolores e leveduras a 25°C, ou seja, parâmetros onde foram

obtidos resultados de contagens mais elevados antes da lavagem das superfícies. Nos parâmetros microbiológicos em que a contaminação inicial é mais reduzida, não se observam diferenças entre embalagens de madeira e de plástico, em termos de resultados aceitáveis após higienização.

A Figura 4.13 apresenta, para cada parâmetro pesquisado e enumerado, a % de resultados aceitáveis, após higienização das embalagens, por tipo de metodologia ensaiada.



**Figura 4.13** – Valores médios dos resultados aceitáveis (%) obtidos após higienização das embalagens de hortofrutícolas analisadas por tipo de metodologia.

Pode verificar-se que, de um modo geral, a utilização de solução desinfetante foi o método mais eficaz na remoção da contaminação, obtendo-se mais resultados aceitáveis (em %) após higienização. Para melhorar estes resultados pode aumentar-se o tempo de contacto com o desinfetante e/ou secar as embalagens após as lavagens tal como indicado por Ak *et al.* (1994).

## 5. Conclusões e Recomendações

O estudo realizado e apresentado neste trabalho pretendia comparar metodologias em termos de eficácia na higienização de embalagens de madeira e plástico utilizadas no acondicionamento e transporte de hortofrutícolas. Sobretudo, pretendia-se estudar a eficácia de metodologias que são regularmente utilizadas pelos comerciantes e distribuidores que utilizam estas embalagens, água corrente, água à pressão e solução desinfectante.

Os resultados obtidos permitem constatar que quanto maior é a contaminação das embalagens mais difícil é a sua remoção na higienização (para alguns grupos de microrganismos). É portanto, essencial que estas embalagens sejam regularmente higienizadas, o que habitualmente não se verifica, embora as boas práticas assim o recomendem.

As metodologias testadas foram menos eficazes na remoção de totais viáveis (a 37°C e a 22°C), de bolores e leveduras a 25°C e particularmente de *P. aeruginosa*. Em relação aos restantes parâmetros, a eficácia da higienização foi significativamente mais elevada, embora, para muitos indicadores, a contaminação inicial fosse muito reduzida. Para avaliar efectivamente a eficiência da higienização na remoção de alguns destes contaminantes das caixas de hortofrutícolas serão necessários mais ensaios e com caixas contaminadas com valores significativamente mais elevados. Verificou-se, também, que as embalagens de madeira são de higienização mais difícil do que o plástico, sobretudo em termos da remoção de totais viáveis (a 37°C e a 22°C) e de bolores e leveduras a 25°C, ou seja, parâmetros onde foram obtidos resultados de contagens mais elevados antes da lavagem das superfícies.

Das três metodologias estudadas, água corrente, água à pressão e solução desinfectante, esta última foi a mais eficaz na higienização das caixas. No entanto, embora o desinfectante utilizado tenha eliminado, eficientemente, *B. cereus* das superfícies, em relação à contaminação com pseudomonas, a sua eficácia foi menor, assim como em relação à remoção de bolores e de leveduras.

Seria desejável, futuramente, testar novas formas de higienização como, por exemplo, uma combinação das duas metodologias testadas, ou seja a lavagem de embalagens com desinfectante diluído em água mas aplicada sobre pressão. Ou, por exemplo, combinar a acção de um detergente com um desinfectante e/ou secar as embalagens após as lavagens.

Podem também ser testadas, soluções desinfectantes com maior poder na remoção e eliminação de bolores e leveduras, dado que são habitualmente estes microrganismos que mais contaminam este tipo de embalagens. Seria, também, muito interessante, analisar a eficiência do processo de limpeza e desinfecção que o MARL tem instalado, para as caixas de plástico, para verificação do mesmo.

Por outro lado, é necessário que sejam definidos critérios concretos e objectivos para uma correcta avaliação da limpeza e desinfecção de superfícies. Não há ainda, neste campo, uma normalização de valores a qual é necessária para assegurar a higiene e a segurança alimentar.

## 6. Bibliografia

- Abadias, M, Usall, J, Anguera, M, Solsona, C., Viñas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, **123**, 121-129.
- Abrantes, A. I. C. 2007. *Implementação de análises microbiológicas da água para consumo humano*, Relatório de Estágio Curricular da Licenciatura Terminal em Tecnologia e Segurança Alimentar, FCT/UNL, Caparica, 186 p.
- Abrantes, A. 2008. *Higienização de embalagens de produtos horto-frutícolas, comparação entre embalagens de madeira e de plástico*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, FCT/UNL, Caparica, 70 p..
- Acican, T., Alibas, K., Ozelkok, I. 2006. Mechanical Damage to Apples during Transport in Wooden Crates. *Biosystems Engineering*. **96**: 239-248
- Adams, M. R., Moss, M. O. 1997. *Microbiologia de los alimentos*, Editorial Acribia, S.A. (Ed.), Saragoça, Espanha, 464 p.
- Ak, N.O., Cliver, D.O., Kaspar, C.W. 1994 Cutting boards of plastic and wood contaminated experimentally with bacteria. *Journal of Food Protection*, **57**, 1, 16-22.
- Almeida, D. 2005. *Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas*. Sociedade Portuguesa de Inovação. Principia, Publicações Universitárias e Científicas, 112 p.
- Babesí, M., Díaz, R., Guevara, L. e Tapia, M. 2006. Calidad Higiénica y Patógenos Asociados com Melones Mínimamente Procesados Expendidos en Supermercados. In: *Livro de comunicações no I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados*, San Pedro, SP Brazil, 47 – 54 pp.
- Beswick, R., Dunn, D. 2002. *Plastics in Packaging – Rapra Market Report*. Rapra Technology Limited. 7-39 pp.
- Beuchat, L.R. 1998. *Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review*. World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2.
- Beyer, G., Guðbjörnsdottir, B. 2002. *Project Part Report no. 8: Wood in the food industry – Guidelines for handling wooden pallets and packaging*. Nordic Industrial Fund – Nordic Wood 2.
- Camelo, A.F.L. 2004. *Manual for the preparation and sale of fruits and vegetables – From field to market*. FAO Agricultural Services Bulletin 151. Rome, Italy.
- Decisão da Comissão nº 2001/471/CE de 8 de Junho. *Jornal das Comunidades* nº **L165**/48 de 21 de Junho de 2001.

Decreto-Lei 366-A/97 1997. *Princípios e Normas aplicáveis ao sistema de gestão de embalagens e resíduos de embalagens*. Diário da República nº **293**, I Série-A, 20 de Dezembro de 1997, 6732- (498-502) pp.

DeVere, E., Purchase, D. 2007. Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. *Food Microbiology*. **24**: 425-430

DTI sem data. *Wood and Food goes finally hand in hand. Surprised?* Relatório elaborado no âmbito do projecto nórdico de cooperação entre Danish Technological Institute, Norwegian Institute of Wood Technology, Trätekt, Icelandic Fisheries Laboratories and Fiskeriforskning.

Dutka, D. 1978. *Methods for microbiological analysis of water, wastewater and sediments*. Canada Center for Inland Waters. Burlington, Ontário, Canadá

EN ISO 6887 -1 1999. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal solutions*)

FDA. 2001. *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook – The “Bad Bug Book.”* U.S. Food and Drug Administration- Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Fernando, A.L. 2008. *Folhas de Apoio à disciplina de Acondicionamento e Embalagem de Alimentos*, GDEH, FCT/UNL

Fernando, A.L.A.C. 1996. *Valorização da biomassa obtida em lagoas fotossintéticas de alta carga a partir de um efluente de suinicultura*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Alimentar, FCT/UNL, Caparica, Portugal, 147 p.

Fontes, J., Guarienti, A. 2007. Absorção do etileno pelo produto AlwaysFresh® na qualidade pós-colheita do mamão papaya “Golden”. In: *Campo Vivo comunicações* (<http://www.campovivo.com.br/artigos.asp>)

Gough, N. Dood, C. 1998. The survival and disinfection of *Salmonella typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control*. **9**: 363-368

Gustafsson, K., Jönson, G., Smith, D., Sparks, L. 2006. *Retailing Logistics & Fresh Food Packaging*. The Chartered Institute of Logistics and Transport. 71p

Hernandez-Brenes, C. 2002. Good Manufacturing Practices for Handling, Packing, Storage and Transportation of Fresh Produce. In: *Improving the Safety of Fresh Fruits and Vegetables: A Training Manual for Trainers, Section III*. Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition

ISO 16649-2. 2001 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide*

ISO 4831. 2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique*

ISO 6222. 1999. *Water Quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.*

ISO 7899-1. 1998. *Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water.*

ISO 8199. 2005. *Water quality – General guide to the enumeration of microorganism by culture.*

ISO/TC 11133-1. 2000. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1. General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory) microorganisms by culture),*

ISO/TC 11133-2. 2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2. Practical guidelines on performance testing of culture media),*

Legnani, P., Leoni, E., Berveglieri, M., Mirolo, G., Alvaro, N. 2004. Hygienic control of mass catering establishments microbiological monitoring of food and equipment. *Food control*, **15**, 205-211.

Lehto, M., Kuisma R., Määttä, J., Kymäläinen, H.-R., Mäki, M. 2010. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. *Food control*, **22**, 469-475.

Lidon, F., Silvestre, M. 2008. *Conservação de Alimentos – Princípios e Metodologias*. Escolar Editora. 25p

Mendes, B. Oliveira, J.F.S. 2004. *Qualidade da água para consumo humano*. LIDEL, Edições Técnicas, Lda, Lisboa, 626 p.

Milling, A., Kehr, R., Wulf, A., Smalla, K. 2005. The use of wood in practice – a hygienic risk? *Holz als Roh- und Werkstoff*. 63: 463–472

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (1999). Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control* **10**: 117–143.

National Standard Method F15i1.4. 2005. *Enumeration of Bacillus cereus and other Bacillus species*, Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, Specialist and Reference Microbiology Division, NHS, HPA & NPHSW, UK

NP 1828. 1982. *Microbiologia Alimentar. Colheita de amostras para análise microbiológica.*

NP 1829. 1982. *Microbiologia Alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica*

NP 2079 .1989. *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para análise microbiológica.*

NP 2308 .1986. *Microbiologia alimentar. Regras gerais para pesquisa de Escherichia coli*.

NP 3277-1 .1987. *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25°C*.

NP 3277-2. 1987. *Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte 2: Incubação a 37°C*.

Poças, M., Moreira, R., 2003. *Segurança Alimentar e Embalagem*. ESB/UCP, Porto

Poças, M.F.F. e Oliveira, F.A.R. 2001. *Manual de Embalagem para Hortofrutícolas Frescos*. Serviços de Edição da ESB/UCP (1ª Ed) Porto, Portugal, 29 p

Rapusar, R. Rolle, R. 2009. Management of reusable plastic crates in fresh produce supply chains – A technical guide. *Food and Agriculture Organization. Regional Office for Asia and the Pacific*.

Regulamento (CE) Nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* L **139** de 30 de Abril de 2004, 1-54 pp.

Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*, L **322** de 7.12.2007, 12-29 pp.

Revol-Junelles, A., Miguindou-Mabiala, R., Roger-Maigné, D., Millièrre, J. 2005. Behavior of *Escherichia coli* cells and *Bacillus cereus* spores on poplar wood crates by impedance measurements. *Journal of Food Protection*, **68**: 80-84

Robertson, G.L. 2006. *Food Packaging. Principles and Practice*. 2nd edition, CRC Press. Boca Raton, 550 p.

Roever, C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control*. **9**: 321-347

Acedidos entre Junho e Setembro de 2010:

[1]<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-26-27.pdf>

[2][http://image.ec21.com/image/farmex/oimg\\_GC03901774\\_CA03901794/Fresh\\_Iceberg\\_Lettuce.jpg](http://image.ec21.com/image/farmex/oimg_GC03901774_CA03901794/Fresh_Iceberg_Lettuce.jpg)

[3]<http://www.feagri.unicamp.br/unimac/fotos/beneficiamento13b.jpg>



- [4] <http://www.fazendasaojudas.com.br/imagens/cumbuca%20cerejaDSC07209%20G.jpg>
- [5] <http://holidayfruitboxes.com/images/fruitbox4full.jpg>
- [6] <http://www.caixasplasticasgecal.com.br/produtos/logikaixa/frutas/6418/caixa-plastica-22.jpg>
- [7] [http://4.bp.blogspot.com/\\_HIoFtsKCXxk/THPD5gmcUCI/AAAAAAAAAC8U/JJ0ibtAFFW8/s1600/3543.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_HIoFtsKCXxk/THPD5gmcUCI/AAAAAAAAAC8U/JJ0ibtAFFW8/s1600/3543.jpg)
- [8] <http://www.terrapro.com.br/imagens/full/B8844.jpg>
- [9] <http://www.embar.pt/index.asp?info=embalagens#2290>
- [10] <http://www.palletcentral.com/PalletUser/PalletUsers.htm>
- [11] [http://www.hotfrog.com.br/Uploads/PressReleases/PALLETES-PALLETS-DE-PLASTICO-PALLETS-DE-MADEIRA-CAIXAS-ENGRADADOS-EMBALAGEM-DE-MADEIRA-124243\\_image.jpg](http://www.hotfrog.com.br/Uploads/PressReleases/PALLETES-PALLETS-DE-PLASTICO-PALLETS-DE-MADEIRA-CAIXAS-ENGRADADOS-EMBALAGEM-DE-MADEIRA-124243_image.jpg)
- [12] <http://www.solostocks.pt/img/paletes-4-entradas-leves-230627z0.jpg>
- [13] [http://www.uniagro-ind.com.br/img/especialpvc/caixa\\_madeira.gif](http://www.uniagro-ind.com.br/img/especialpvc/caixa_madeira.gif)
- [14] <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/r44.jpg>
- [15] <http://www.curlew.co.uk/secondhandmarquees/Pictures%20of%20secondhand%20marquees2/Plastic%20crates%20stackable.jpg>
- [16] <http://www.sandersonweatherall.com/images/content/2009plantandmachineryphotographs/HuntleighHealthcare/277.JPG>
- [17] [http://www.tootoo.com/d-rp3211441-Collapsible\\_Basket\\_Plastic\\_Crate/](http://www.tootoo.com/d-rp3211441-Collapsible_Basket_Plastic_Crate/)
- [18] <http://www.logismarket.co.uk/ip/goplasticpalletscom-perforated-stackable-nestable-food-safe-plastic-box-f5350-perforated-stackable-nestable-food-safe-plastic-box-526757-FGR.jpg?imgmax=800>
- [19] [http://www.envapack.com/envases\\_empaques309.htm](http://www.envapack.com/envases_empaques309.htm)

[20] <http://www.ecopetextrusion.co.uk/images/strawberries.jpg>